

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590255  
 研究課題名（和文） カテコラミンの血管平滑筋増殖効果における細胞接着因子CD146の作用機構の解明  
 研究課題名（英文） Functional analysis of cell adhesion molecule, CD146 in the proliferation of smooth muscle by catecholamines.  
 研究代表者 平 英一 (TAIRA EIICHI)  
 岩手医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：60263240

## 研究成果の概要：

本研究は、カテコラミンの血管増殖作用における細胞接着因子CD146の関与を解明するものである。CD146はカテコラミン刺激により発現が増大し、アセチルコリンによっては制御を受けないことが明らかとなった。カテコラミンの作用は $\alpha$ 受容体を介することが明らかとなった。この発現変化は神経系由来細胞では認められず、血管平滑筋特異的情報伝達機構が想定された。一方、血管伸展刺激によるCD146の発現変化については明確な変化は認められなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般  
 キーワード：心・血管・細胞接着・発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子の発現量の変化は細胞の接着性に変化を与え、細胞の運動性や細胞分裂サイクルに影響を与える。動脈硬化などで生じる平滑筋の増殖、遊走には細胞接着分子の発現変化が深く関わっていると考えられる。ギセリン/CD146は我々が見出した細胞接着因子であり、これまでにこの分子が細胞の遊走や神経突起伸展、微絨毛の伸長など細胞の形態変化に関わっていること、腫瘍においては

転移・浸潤能を増大させることを報告している。血管系においては、ギセリン/CD146は中膜肥厚時に平滑筋において発現を増大させていることを見出しているが、今回、種々の増殖因子に加えカテコラミン類もギセリン/CD146の発現増大を引き起こすことを見出した。カテコラミン類は血圧調節に重要な働きをしているが、血管壁の肥厚も促進することが知られており、ギセリン/CD146はその効

果の作用分子の一つと考えられる。ギセリン/CD146の血管平滑筋のトロフィック作用における働きを明らかにすること、その発現調節機構を明らかにすることは血圧、動脈硬化のコントロールにつながると考え、本研究を想起するに至った。これまでの研究から、ギセリン/CD146の生理作用、発現調節に関しては実績があり、血管平滑筋における研究も十分に実行可能であると考え。

## 2. 研究の目的

血管平滑筋に対するカテコラミン、特にノルアドレナリンの作用は平滑筋の収縮が主であるが、これ以外にも、平滑筋細胞の増殖促進や遊走促進作用がある事が知られている。この平滑筋の増殖は動脈硬化の大きな原因の一つである。動脈硬化の発症には炎症反応に加え、平滑筋に対してはIGF-1等の様な増殖因子が増殖に関与していることが報告されているが、カテコラミンも血管平滑筋の増殖を促進し、さらに遊走も促進することから（平滑筋トロフィック作用）、高血圧・動脈硬化の憎悪因子の一つとして挙げられる。カテコラミンの平滑筋トロフィック作用に関しては、受容体から細胞内への情報伝達経路の解析が多くなされているが、実際の作用発現関連分子への直接の効果に関しては未だ不明な点が多く残っている。また、動脈硬化の際には平滑筋細胞の分裂や遊走に加え、炎症性細胞の浸潤も生じるが、これらの事象には細胞間の接着の変化が重要な役割を果たしている。しかし、血管平滑筋における細胞接着の研究は主に内皮や炎症性細胞との関連のものが多く、またインテグリン類やICAMやVCAM等の分子での解析に限られており、血管平滑筋の増殖や遊走に関する報告は多くはない。一方、我々の見出した細胞接着因子ギセリン/CD146 (Neuron 1994, JBC 1995) は血管系において正常時には血管内皮にの

み発現しているが、病的な動脈壁の肥厚が生じる際には平滑筋で発現が上昇すること、平滑筋の増殖を促進するIGF-1による発現制御を受けていることを我々は報告している (BBRC 2004)。さらに、我々は血管平滑筋におけるギセリン/CD146の発現がカテコラミン類による強力な発現制御を受けていることを見出し、ギセリン/CD146はカテコラミンの動脈硬化促進作用の発現に関与している事が推察される。従って、本研究ではカテコラミンの動脈壁肥厚効果におけるギセリン/CD146の機能を明らかとする。また、カテコラミンによるギセリン/CD146の発現誘導機構を明らかとする。これらを明らかとすることにより、将来的にはその治療へ役立てることを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1)血管平滑筋におけるギセリン/CD146の発現制御機構の解明

平滑筋由来 A10 細胞におけるカテコラミンによるギセリン/CD146の発現誘導を明らかとしているが、アドレナリン各受容体刺激薬を用いて実際に血管平滑筋のギセリン/CD146の発現誘導に関係する受容体を特定し、受容体から遺伝発現制御に至る情報伝達経路を明らかとする。また、遺伝子上流域の責任領域を決定する。このため A10 細胞および血管平滑筋初代培養細胞に各種アドレナリン受容体刺激薬を加えて培養し、それらから経時的に mRNA を抽出する。さらにこの mRNA を用いて定量的 RT-PCR を行うことによりギセリン/CD146の発現誘導が起こるかを検討する。さらに拮抗薬も用いて受容体を確認すると共に、受容体遮断によりギセリン/CD146の発現が抑制されるかを確認する。

またギセリン/CD146 上流域の発現制御機構を検討するためにルシフェラーゼレポーター遺伝子を用い、各種ギセリン/CD146 上流域欠損ミュータントを作成し、転写制御責任領域の決定を行う。

(2) 伸展刺激に対する CD146 の発現の検討  
ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞（以下 VSMC）は、生後 6~7 週齢のラットから採取した大動脈の周辺支持組織を取り除いた後、大動脈片を細かく裁断して培養ディッシュ上で浮遊しない程度の培養液（DMEM、20%FBS）で満たした状態で 2~3 日間 CO<sub>2</sub> incubator 内に放置、切片からディッシュ上に細胞が増殖してきたら切片を取り除き、培養液（DMEM、10%FBS）をさらに添加してコンフルエントになるまで培養を継続した。増殖してきた細胞が血管平滑筋かどうかについては  $\alpha$ -smooth muscle actin（以下  $\alpha$ -SMA）で免疫染色を行い確認した。VSMC は 3 継代から 5 継代までの細胞を実験に使用した。ラット大動脈平滑筋由来の培養細胞である A10 細胞も実験に用いた。実験はストレックス社製細胞伸展培養装置、MODEL:ST-140 を用いて 60Hz、120% の条件で 24、32、48 時間の伸展培養を行い、形態変化の観察と RT-PCR により遺伝子発現の変化について比較 Ct 法にて（静置培養した細胞での発現を対照として）解析した。ストレッチ用の培養チャンバーはコラーゲンでコーティングして培養に用いた。遺伝子は CD146、 $\alpha$ -SMA、インテグリン- $\alpha$ 1、- $\alpha$ 7、- $\beta$ 1、カドヘリン（N、T）、caldesmon、syndecan-1、-4 とコラーゲン I について検討した。

#### 4. 研究成果

ギセリン/CD146 の血管平滑筋における生理的・病的機能の解明

研究には主にマウスギセリンの上流域 1.5kbp を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを用いた転写活性で検討を行った。細胞は、ラット平滑筋由来の A10 細胞と、ラット大動脈由来の初代培養細胞を用いた。A10 細胞を用いた実験において、カテコラミン受容体の中でも  $\alpha$  受容体刺激薬であるフェニレフリンによってギセリンの転写活性の上昇を認めただけでなく、アセチルコリン受容体刺激薬であるカルバコールによる発現抑制が認められた。一方、残念ながら、初代培養細胞系においては以上のような明らかな発現変化は確認できなかった。

もう一つの検討課題である各種増殖因子の影響については、これまでに明らかとしている IGF-1 に加えて、FGF による発現増大が確認できた。また、この他に、カテコラミンと同様に血管を収縮させる物質についてもギセリンの発現に及ぼす影響を検討したが、エンドセリンによるギセリンの発現増大が明らかとなった。

一方、これまでに報告している A10 細胞におけるギセリンの発現を増大させる IGF-1 が、カテコラミン産生細胞である PC12 細胞におけるギセリンの発現を増大させることが明らかとなった。その制御機構に関しては、A10 細胞とは異なる系の存在が示唆された。

伸展刺激に対する CD146 の発現については A10 細胞について解析を行った。まず、細胞の形態変化については、紡錘形をした細胞の長軸方向が伸展方向に対して、より垂直な方向へと経時的に変化した。遺伝子発現変化は、

インテグリン- $\beta$ 1、caldesmon、コラーゲン I と syndecan-1 で 48 時間後までに増加が見られ、カドヘリン (N) と  $\alpha$ -SMA は減少した。しかし、 $\alpha$ -SMA は静置培養に比較して mRNA の発現は少ないが 24 時間から 48 時間にかけて経時的な増加傾向が見られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tsuchiya S, Tsukamoto Y, Taira E, LaMarre J. Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes. *Int J Mol Med*. 19. 381-6. 2007.

2. Saeki M, Irie Y, Ni L, Itsuki Y, Terao Y, Kawabata S, Kamisaki Y. Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation. *J Biol Chem*. 282(16):11786-94. 2007

[学会発表] (計 16 件)

1. Taira E et al, Distribution of gicerin expression in the rat blood vessels. CRT (Cardiovascular revascularization Therapies) Meeting 2008, Washington DC, February 2008

2. Taira E et al, Analysis of gicerin expression in the rat spinal chord. 2nd GSA (Genetic Society of America) Meeting, San Diego, January 2008

3. Eiichi Taira E et al, Expression of CD146 in the Vascular Smooth Muscle Cells. The IX<sup>th</sup> World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics (CPT 2008). Quebec City, Canada July 2008

4. 入江康至他、新規癌抑制遺伝子Amidaは交感神経系細胞でPACAP処理によって発現誘導される、第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 横浜

5. 近藤ゆき子他、ラット脊髄感覚神経路におけるギセリン発現細胞の同定、第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 横浜

6. 水間謙三他、臨床使用濃度の局所麻酔薬が副腎髄質細胞に与える効果、薬理第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 横浜

7. 宮手義和他、コルチゾル産生への 3 種類のタンパク質リン酸化酵素の関与 薬理第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 横浜

8. Taira E et al, Expression of gicerin by NGF. Experimental Biology Meeting Washington DC, April 2007

9. Irie Y et al, Searching a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. The 21st Symposium of the Protein Society, Boston July 2007

10. Irie Y et al, The expression of novel growth suppressor Amida is induced in sympathetic neuroal cells in response to PACAP treatment. 5th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience, Kyoto, October 2007

11. Tachikawa E et al, Geranylgeranyl pyrophosphate is required for  $Ca^{2+}$ -dependent catecholamine secretion. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007 October, San Diego

12. 近藤ゆき子他、ラット感覚神経路のグリア系細胞におけるギセリンの発現, Neuro2007 第50回日本神経化学会大会 2007年9月 横浜

13. 立川英一他, ゲラニルピロリン酸のカテコールアミン分泌における役割 第58回日本薬理学会北部会 2007年9月 札幌

14. 入江康至, 抗うつ薬・抗不安薬・抗精神病薬の薬理, 日本精神科病院協会岩手県支部例会、10月、2007. 盛岡

15. 入江康至他, 新規細胞死関連蛋白質 Amidaの機能解析 第58回日本薬理学会北部会、9月、2007. 札幌

16. 入江康至他, メタンフェタミンによるドパミン終末毒性には小胞体ストレスが関与する 第51回日本神経化学会大会、9月、2007. 横浜

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

平 英一 岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 60263240

(2) 研究分担者

入江康至 岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 70303948  
近藤ゆき子 岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号 70347847

(3) 連携研究者