

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22590210

研究課題名(和文)血管平滑筋の形質変換における電位依存性カルシウムチャネルの役割

研究課題名(英文)The role of voltage-dependent Ca²⁺ channels in phenotype change in vascular smooth muscle cells

研究代表者

砂川 昌範 (SUNAGAWA, Masanori)

琉球大学・医学部・講師

研究者番号：70325835

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)：合成型血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖亢進は絶え間ない細胞周期の回転により支えられている。G1期からS期への移行およびM期ではCa²⁺流入が不可欠である。細胞周期調節と関連するCa²⁺チャネルの特定を試みた。ニフェジピン処理によりVSMCの増殖が濃度依存性に抑制された。高濃度KCl溶液(90 mM)に暴露すると細胞増殖は抑制された。Ca²⁺チャネルサブユニットのみを強制発現すると核内に局在し、細胞内カルシウムの動態に關与する35種類の遺伝子発現を上昇させた。これらの結果から、Ca²⁺の細胞内流入経路の違いとサブユニットにより、VSMCの細胞増殖が調節される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Enhanced cell proliferation of synthetic vascular smooth muscle cells (VSMC) are due to constantly activated cell cycle progression. Entry of Ca²⁺ are necessary both for the progression of G1 to S phase and for the M phase. We aimed to identify Ca²⁺ channels, which were involved in the regulation of cell cycle. The cell proliferation of VSMC was significantly inhibited by treatment with nifedipine. Exposure of VSMC to high KCl (90 mM) also significantly inhibited the cell proliferation. When beta subunit of L-type Ca²⁺ channel was constitutively expressed under the control by tetracyclin, the beta subunit protein was only localized in the nucleus. Microarray analysis demonstrated that 35 genes were significantly upregulated. These results suggest that the regulation of cell proliferation of VSMC might be determined by the specific pathway of Ca²⁺ entry and that the beta subunit in nucleus plays an important role by regulating many genes that involves cytosolic Ca²⁺ homeostasis.

研究分野：生理学

キーワード：形質変換 カルシウムチャネル 血管平滑筋細胞 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化症に見られる血管内膜肥厚や血管形成術後に生じる血管再狭窄は血管平滑筋細胞 (VSMC) の血管中膜から内膜への遊走及び増殖が原因とされている。遊走能及び増殖能を獲得した VSMC では収縮型から合成型への形質変換が生じている。我々は、血小板由来成長因子 (PDGF) および血栓形成後に生じるフィブリン結合トロンビン (bound thrombin) が VSMC を合成型に誘導し (Eur J Pharmacol, 461:1-9, 2003; Int J Tissue React, XXV: 137-148, 2003), さらにその誘導は胎児型ミオシン重鎖アイソフォームである SMemb の発現抑制により制御できることを示した (Heart Vessels, 22:41-47, 2007; J Vasc Res, 46: 55-63, 2009)。すなわち、in vitro にて VSMC の形質を合成型または収縮型に誘導することを可能にした。

合成型 VSMC の増殖亢進は絶え間ない細胞周期の回転により支えられている。また細胞周期、特に律速段階である G 1 期から S 期への移行および細胞分裂を行う M 期では細胞外からの Ca^{2+} 流入が不可欠であることが知られている。VSMC 内への Ca^{2+} 流入方法は数多く存在する。しかしながら Ca^{2+} 流入量、流入経路および時期の相異が細胞周期調節にどのようなインパクトを与えるかは不明である。細胞外からの VSMC 内への主な Ca^{2+} 流入経路の一つに、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルがある。血管平滑筋に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルには L 型 (CaV1.2) と T 型 (CaV3.2) があり、遺伝子座、蛋白構造、電気生理学的特性さらに薬剤感受性などに大きな相違がある。これらの電位依存性 Ca^{2+} チャンネルでは膜電位の変化に伴いチャンネルが開閉し、 Ca^{2+} 流入が生じる。また、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開閉は種々のプロテインキナーゼ (PKA, PKG, PKC および Tyr-PK) により調節されている。従って、種々の血管作働因子は VSM 細胞膜上の特定の受容体に結合し、前述のプロテインキナーゼ群の一部を活性化し、チャンネルの開閉を調節していると予想されている。

我々は、これまで VSM における cAMP/PKA、cGMP/PKG, Tyr-PK による CaV1.2 活性の調節機序について検討してきた。その結果、cAMP/PKA および Tyr-PK は CaV1.2 活性を上昇させ、cGMP/PKG は減少させることを明らかにした (J Vasc Res 35: 303-309, 1998; Pflügers Arch 437:317-323, 1999; Jpn J Physiol 51:115-119, 2001)。さらに、cAMP が type I β PKG を活性化して CaV1.2 活性を抑制するクロストーク機序の存在が示唆された。

WKY ラットおよび SHR ラットを用いた最近の研究により、CaV1.2 には約 51 種類のスプライスバリエントが存在することが明らかにされた (Biochim Biophys Acta 1783:118-130, 2008)。WKY ラットで 10% 以上の発現割合を占める 2 種類のバリエントは SHR ラットでは発現割合が減少すると同時に、新たに 3 種類のバリエントの割合が増加した。すなわち、血

圧上昇にตอบสนองしたスプライシング調節を介して、VSMC での CaV1.2 発現は動的に変化し、その結果 VSMC 内への Ca^{2+} 流入量の変化が生じることで形質変換が誘導されると予想される。さらに、CaV1.2 では β サブユニット ($\beta_1, \beta_{2a}, \beta_{2b}, \beta_{2c}, \beta_3$) との組み合わせを含めると 10~25 種類の主要なチャンネル構成が存在することとなる。これまでの研究では、スプライスバリエントの発現割合が不明な細胞条件下で CaV1.2 の機能が検討されてきたため血管作働因子および薬物反応等に矛盾が見られた。したがって、VSMC 内への Ca^{2+} 流入に伴うプロテインキナーゼの活性化の役割と空間的・時間的 Ca^{2+} 流入の相違と細胞周期調節との関連を調べるためには、合成型および収縮型の各形質の VSMC で発現する CaV1.2 の種類と割合を加味した解析が不可欠となる。

2. 研究の目的

形質変換すなわち細胞周期の調節に関与する血管平滑筋電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを特定するために CaV1.2 および CaV3.2 mRNA を標的とする siRNA により各チャンネル発現の抑制下で、形質変換の評価を行う。さらに、合成型または収縮型の二種類の形質を有する血管平滑筋細胞を PDGF または SMemb-siRNA を用いて作製し、各形質の平滑筋細胞に発現するスプライスバリエントの種類と発現割合を CaV1.2 および CaV3.2 cDNA ライブラリーを大腸菌に導入し、コロニー PCR 法にて行う。哺乳類細胞発現系を用いて Ca^{2+} チャンネルのスプライスバリエントの電気生理学的特性およびプロテインキナーゼによる調節の有無をパッチクランプ法により解析し、細胞内 Ca^{2+} 流入の違いを解明する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞の調整: CaV1.2 および CaV3.2 に対する特異的 siRNA を導入する細胞として、ラット大動脈由来培養血管平滑筋細胞株 (A7r5) を用いる。A7r5 では CaV1.2 および CaV3.2 が発現しており、パッチクランプにて L 型および T 型 Ca^{2+} 電流の測定が可能である。CaV1.2 および CaV3.2 の各スプライスバリエントの発現実験を行うために、内在性 CaV1.2 および CaV3.2 発現のみられない発現実験用培養細胞株 (COS7 細胞、CHO 細胞、293 細胞) を用いる。

(2) CaV1.2 および CaV3.2 に対する特異的 siRNA を作成および VSMC 内導入: Ambion 社の siRNA target finder ツールを使用して CaV1.2 および CaV3.2 に対する特異的 siRNA 配列を検索し、我々が既に報告した方法 (Heart Vessels, 22:41-47, 2007; J Vasc Res, 46: 55-63, 2009) に従い、pSilencerTMneoプラスミドベクターの Bam HI および Hind III 制限酵素部位に挿入し作製する。組換えプラスミドベクターを direct PCR 法によりクローニングし、大腸菌内で増幅させた後、Maxi-prep 法を用いて高純度のプラスミドを精製する。

VSMC内への特異的siRNAの導入は、研究分担者で同一研究室の松下正之教授らの開発した選択的細胞内導入ペプチド(*J. Neurosci* 21: 6000-6007, 2001; *Nat Med* 10: 305-309, 2004)を用いる。CaV1.2およびCaV3.2特異的siRNAの効果を実タイムPCR法およびウェスタンブロット法を用いて評価する。

(3) 形質変換の評価方法：血管平滑筋細胞の形質変換は我々が既に報告した方法(*Heart Vessels*, 22:41-47, 2007; *J Vasc Res*, 46: 55-63, 2009)に従いPDGFまたはbound thrombinにより誘導し、ミオシン重鎖アイソフォーム(SM1, SM2およびSMemb)の遺伝子発現比を算出し評価する。さらに、細胞増殖能をWST-1アッセイにて行い、細胞周期活性として医学生物学研究所(株)社製サイクリンA2/サイクリン依存性キナーゼ2活性を測定する。

(4) CaV1.2およびCaV3.2のサブユニットの種類と発現割合の測定：Tangらの方法に従い、full-lengthの血管平滑筋由来のCaV1.2 cDNA(エキソン1a-50およびエキソン1-50)を培養細胞から抽出したRNAより作製する(*Biochim Biophys Acta* 1783:118-130, 2008)。CaV1.2 cDNAを含むプラスミドライブラリーを用いて大腸菌の形質転換を行い、選択的プライミングで生じたバリエーションの発現をエキソン特異的PCRプライマーを用いたコロニーPCRを行い、バリエーションの種類と発現割合を決定する。

(5) パッチクランプ法によるL型Ca²⁺チャンネル電流の測定：膜電位固定法により内向きL型Ca²⁺チャンネル全細胞電流を測定する(*J Vasc Res* 35: 303-309, 1998)。

4. 研究成果

(1) 平滑筋細胞増殖における細胞内カルシウム流入の関与

電位依存性Ca²⁺チャンネル(CaV1.2およびCaV3.2)を介する血管平滑筋細胞内へのCa²⁺流入の細胞周期調節との関連を調べるために、CaV1.2チャンネルブロッカーであるニフェジピン存在下における細胞増殖への効果を調べた。その結果、培養血管平滑筋細胞A7r5の細胞増殖は、ニフェジピン濃度依存性に抑制された。すなわち、CaV1.2を介したCa²⁺の細胞内

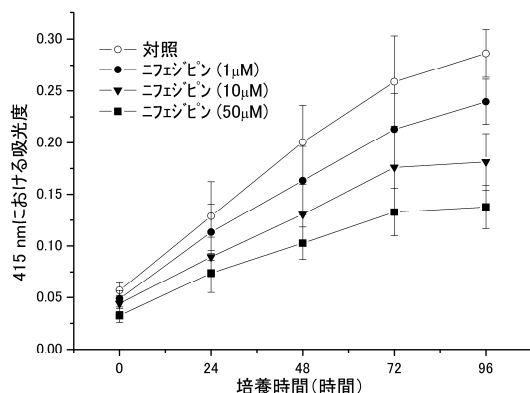


図1. ラット培養血管平滑筋細胞におけるnifedipineの影響

流入は、細胞増殖に不可欠であることが示唆された(図1)。

しかしながら、高濃度のKCl溶液(90 mM)に細胞を暴露し、膜電位を強制的に脱分極させた場合、細胞増殖は抑制された。これらの結果から、Ca²⁺の細胞内流入経路の違いにより、細胞増殖調節反応が異なる可能性が示唆された。

(2) 各種カルシウムチャンネル発現抑制による形質変換への影響

ヒト血管平滑筋細胞CaV1.2およびCaV3.2を標的とするsiRNAを作製した。また、カルシウムチャンネル以外のカルシウム流入経路となるTRPV2を標的とするsiRNAを作製した。さらに、CaV1.2のサブユニットであるCACNB3に対するsiRNAも作製した。現在、各siRNAの効果を用いて培養ヒト血管平滑筋細胞を用いて効果を調べている。

(3) 電位依存性Ca²⁺チャンネルサブユニットの細胞増殖における役割

血管平滑筋の形質変換における電位依存性Ca²⁺チャンネルのサブユニットの関与を調べるために、テトラサイクリン刺激によるサブユニット遺伝子発現誘導可能なFlp-in-T-REx293細胞(ヒト胎児由来腎臓上皮細胞)を樹立した。テトラサイクリン不含の牛胎児血清下で継代培養を3回繰り返した後、テトラサイクリン添加と無添加の細胞を24時間培養した。Western blot法にてサブユニット蛋白の発現の有無を確認できた発現OFF状態の細胞と発現ON状態の細胞より全RNAを抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞内カルシウムの動態に関与する35種類の遺伝子発現が著明に上昇していた。一方でドパミンハイドロキシラーゼ遺伝子の著明な減少がみられた。

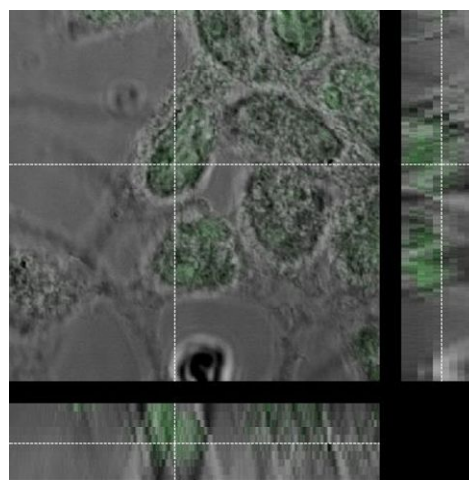


図2. サブユニットタンパク質の細胞内局在

さらにサブユニットタンパク質の局在性を調べるために抗ウサギカルシウムチャンネルサブユニットポリクローナル抗体(AB5230, Millipore社製)を用いて蛍光免疫組織化学法を行った。その結果、図2に示

すように サブユニットタンパク質は核内に豊富に存在するのが明らかとなった。すなわち、サブユニットタンパク質は遺伝子の発現制御を介して、細胞増殖を制御している可能性が示唆された。

(4) 結果のまとめ

これらの結果から、Ca²⁺の細胞内流入経路の違いとサブユニットにより、VSMCの細胞増殖が調節されている可能性が示唆された。

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3件)

- 1) Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M. Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. Biochem Biophys Res Commun. 457(2):206-12, 2015. 「査読有」
- 2) Sunagawa M. Involvement of Ca²⁺ channel activity in proliferation of vascular smooth muscle cells. Pathophysiology 17(2):109-118, 2010. 「査読有」
- 3) Kosugi T, Nakamura M, Sunagawa M. Transition of pathophysiological significance of plasminogen activator inhibitor-From a chief player in antiinflammation, antifibrinolysis to that in the development of insulin resistance. Pathophysiology 17(2):101-108, 2010. 「査読有」

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

砂川 昌範 (SUNAGAWA, Masanori)
琉球大学・医学部・講師
研究者番号：70325835

(2)研究分担者

松下 正之 (MATSUSHITA, Masayuki)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30273965

中村 真理子 (NAKAMURA, Mariko)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40180400

(3)連携研究者

なし