

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590240

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞の可塑的变化における細胞内ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of cellular network for plastic change of vascular smooth muscle cell.

研究代表者

岡垣 壮 (OKAGAKI, Tsuyoshi)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：80185412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：血管の壁を構成している血管平滑筋細胞は、血管に弾力性を与えることにより血圧調整に関わる。種々の生活習慣病の発症は血管が詰まる動脈硬化症が原因となる場合が多く、このとき血管平滑筋細胞が性質の異なる細胞へと変化する。このような病的な変化をするときに、細胞内でどのような遺伝子が関与しているのかを調べた結果、T-plastinを含むいくつかの遺伝子が重要な関与をしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Vascular smooth muscle cell composing wall of blood vessel contributes the control of blood pressure, by stretching or contracting the cell body. Life style related illness is often originated by atherosclerosis. In such vessel, normal contractile smooth muscle cell changes its property and differentiates into synthetic phenotype. To know the mechanism of the phenotypic change of the cell, we investigated expression level of several genes, and we found that several genes including T-plastin were related to the beginning of atherosclerosis.

研究分野：薬理学(医歯薬学)

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：血管平滑筋 動脈硬化症 細胞骨格 シグナル伝達 形質変換

1. 研究開始当初の背景

近年わが国では深刻な高齢化社会を迎えており、さらに食生活の欧米化などによる生活習慣の変化により、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞）、脳血管障害などの動脈硬化症疾患が増加している。この要因として脂質代謝の異常による血管平滑筋の脱分化が注目されている。動脈硬化症が進行するとマクロファージや内皮細胞から分泌される成長因子の作用によって、血管収縮や弾力性等の機能をはたす正常な収縮型平滑筋細胞が形質変換をおこして収縮能のない合成型細胞へと変化する。収縮型細胞は中膜の細胞外マトリックス（IV型コラーゲン、ラミニンなど）と接着しているが、合成型細胞はガン化した細胞のように活発に増殖をくりかえしながら中膜から離脱して内膜へと遊走し、最終的にはマクロファージとともに内膜に肥厚を形成し狭窄をひきおこす。しかし動脈硬化症を引き起こす血管平滑筋細胞の形質変換の分子メカニズムに関しては、いくつかの遺伝子の候補が上がっているもののいまだ十分に解明されていない。血管平滑筋細胞(VSMC)は心筋や骨格筋と異なり可塑性があり、分化後でも血管内の環境の変化により、活発に増殖する未分化の細胞へと脱分化する性質があり形質変換と呼ばれている。この現象は動脈硬化症疾患や血管壁傷害においてひんぱんに観察される。本研究では形質変換時に特異的に発現量の変動する遺伝子の動態を細胞レベルで解析することにより、その詳細な細胞内ネットワークの全容を解明できるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

血管平滑筋細胞(VSMC)は骨格筋や心筋と異なり可塑性があり、血管組織において正常な収縮型細胞に分化後であっても血管内の環境の変化により、収縮能の低い未分化の合成型細胞へと脱分化する。また脈管形成や血管新生の際には合成型細胞が増殖後に収縮型

細胞に分化する。このように形質が変化すると細胞内で発現しているタンパク質の組み合わせやネットワークが大きく変化することが予想される。しかしその全容はいまだ十分には明らかになっていない。本研究ではすでにスクリーニングした収縮型あるいは合成型細胞特異的な遺伝子を手がかりにして、それらと相互作用する因子を同定することにより、そのネットワークを分子レベルで明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの作成

スクリーニングした遺伝子を大腸菌で発現するため、マウス VSMS の total RNA から合成した cDNA をテンプレートに用いて T-plastin, eukaryotic elongation factor beta, rho GTPase 3, SM22, myosin regulatory light chain (LC20)の全長を PCR で増幅した。T-plastin, eukaryotic elongation factor beta, SM22, および LC20 は pET21d の NcoI/EcoRI 部位にサブクローニングした。また rho GTPase 3 は pGEX6.1 にサブクローニングした。これらのプラスミドを BL21(DE3)に形質転換し、IPTG で誘導をかけて大腸菌での発現をおこなった。

T-plastin の全長(アミノ酸残基 1-630)、及び N 端のアクチン結合部位(アミノ酸残基 1-375)、C 端のアクチン結合部位(アミノ酸残基 376-630)を PCR で増幅し、pEGFP の EcoRI/BamHI 部位へサブクローニングをおこなった。

(2) タンパク質の精製および免疫

発現した T-plastin は硫安分画、DEAE-toyopearl クロマトグラフィーで精製した。発現した SM22 は硫安分画、SP-toyopearl で精製した。発現した LC20 は硫安分画後も大腸菌由来の不純物が多かったため、0.1 M NaCl を加えて 80℃、5 分加熱して大腸菌のタンパク質を熱変性させてから遠心して上清を集めた。これらの

T-plastin, SM22, LC20を SDS-PAGE にアブライシ、それぞれのバンドを切り出して電氣的に溶出してから抗原に用いた。抗原とアジュバントである Titer Max Gold を等量混合しトリに免疫した。T-plastin については追加免疫を 6 回、SM22 については 7 回、追加免疫を、LC20 については 8 回おこなって抗体価が十分上昇していることをウェスタンブロットで確認した。

トリ胸筋の骨格筋 α -actin、砂囊平滑筋 α -actin、ブタ大動脈平滑筋 α -actin はアセトンパウダーから精製した。砂囊平滑筋 tropomyosin は砂囊を 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT で抽出後、熱処理、硫酸分画、DEAE-toyopearl クロマトグラフィーで精製した。

(3) T-plastin と actin 線維の結合実験

T-plastin と actin 線維の結合は 0.5 mg/ml actin, 0~0.3 mg/ml T-plastin, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT でおこなった。その後混合溶液を高速遠心あるいは低速遠心して、actin 線維との結合量および actin 束化活性をそれぞれ定量した。上清と沈殿を SDS-PAGE にアブライシ、plastin のバンドをデンシトメトリーで定量して、actin との結合量を算出した。

(4) VSMC の培養

ラット大動脈 VSMC はラットの腹部大動脈を摘出後、イソジンで無菌処理してからコラゲナーゼで 12 時間消化し、VSMC を分散させた。これをディッシュに移し、遊走してディッシュに付着した細胞を使用した。10%血清(FBS)を含む DMEM で培養を行い、細胞数が増加した 2~3 週間後の細胞を実験に使用した。マウス大動脈由来の血管平滑筋培養細胞株 AC01 も 8%血清(FBS)を含む DMEM で培養をおこなった。DIF-1 および DIF-3 は群馬大学の久保原禪博士から譲渡されたサンプルを使用した。培養液に DIF を添加する場合は、これら DIF 化合物を DMSO で可溶化

させてから培地に加えた。

ヒト大動脈由来の初代培養系 (HuAoSMCs)は 231 培地に 5% FBS, 2ng/ml bFGF, 0.5 ng/ml EGF, 5 ng/ml heparin, 5 μ g/ml insulin を添加して培養した。細胞を分化させる場合には、1ng/ml の TGF- β を添加した。タンパク質の発現レベルはウェスタンブロットおよび DNA microarray で解析をおこなった (3D-Gene Human Oligo chip 25K)。ニコチンに 48 時間暴露した HuAoSMCs とニコチンに暴露していない HuAoSMCs のそれぞれから total RNA を抽出して使用した。この total RNA から cDNA を合成して realtime PCR に使用した。Myosin II 10, Myosin II 11, α -actin, α -actin, SM22 については realtime PCR をおこなって発現レベルを定量した。

4 . 研究成果

(1) VSMC の形質変換における T-plastin の関与の検討

RNA 干渉の予備実験として培養平滑筋細胞内 AC01 において T-plastin の挙動についての解析をおこなった。大腸菌で発現した T-plastin を免疫してポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、マウス大動脈由来の AC01 細胞内での T-plastin の発現量および細胞内分布を検討した。ウェスタンブロット、リアルタイム PCR を用いた解析によると、T-plastin の発現量は無血清状態で培地に PDGF を添加すると時間とともに発現量が低下した。また培地に TGF- β を添加すると T-plastin の発現量が時間とともに増加した。細胞の固定をして間接蛍光抗体法で抗 T-plastin 抗体および抗 α -actin モノクローナル抗体で二重染色した。TGF- β を添加した細胞において、T-plastin は α -actin を含む stress fiber に局在することが観察された。また細胞を回収して、ウェスタンブロットにより T-plastin の発現量の変化を定量し、他のマーカー遺伝子の発現量の変化のパターン

と比較した。PDGF を添加した細胞では T-plastin の発現量が少なかったが、TGF- β を添加した細胞では発現量が多かった。 α -actin および高分子量 caldesmon についても同様の結果が得られ、T-plastin が分化マーカーとなりうる可能性が示唆された。T-plastin はアクチン線維を束化するタンパク質であるが、それ以外の生理活性がないかについても検討をはじめている。

T-plastin の VSMC 細胞内での発現量が少ないため、T-plastin の細胞内局在を詳細に調べるためには GFP ベクターを作製し、平滑筋細胞に導入する必要がある。T-plastin の全長 (アミノ酸残基 1~630)、及び N 端のアクチン結合部位 (アミノ酸残基 1~375)、C 端のアクチン結合部位 (アミノ酸残基 376~630) を pEGFP の EcoRI/BamHI 部位へサブクローニングをおこなった。

(2) T-plastin と actin 線維との結合の定量

大腸菌で発現した T-plastin は骨格筋 actin、砂嚢平滑筋 actin、大動脈平滑筋 actin のいずれとも結合した。T-plastin の砂嚢平滑筋 α -actin 線維や大動脈平滑筋 α -actin 線維に対する結合能は、骨格筋 α -actin 線維に対する結合能よりもやや高かった。T-plastin と actin との結合は Ca^{2+} 存在下の場合も EGTA 存在下の場合もほぼ同等だった。T-plastin はいずれの actin アイソフォームの線維も束ねることが確認された。さらにこの actin 線維の束形成は Ca^{2+} 依存的で、 10^{-7} M 以下では束が形成されるが、 Ca^{2+} 濃度が 10^{-6} M 以上ではこの束形成がおこらなかった。これは暗視野光学顕微鏡観察、および遠心法で上清と沈殿の組成を SDS-PAGE で解析する方法のいずれでも確認できた。しかし発現した T-plastin とアクチンとの結合は、細胞骨格系タンパク質のなかでは親和性が低く、結合実験によって推定した解離定数は 5×10^{-6} M であった。また砂嚢平滑筋由来 tropomyosin は T-plastin と actin との結合を容量依存的に

阻害した。

上記のポリクローナル抗体を用いて、ブタ大動脈に T-plastin が存在することがわかったので、大動脈から T-plastin を種々の条件で抽出し、硫酸分画、Phenyl-toyopearl、DEAE-toyopearl というプロセスで T-plastin を精製することができるようになった。平滑筋の臓器から精製したインタクトの T-plastin についても actin 線維との結合実験をおこなった。組織から直接得られた T-plastin と大腸菌で発現した T-plastin とを使って骨格筋 α -actin 線維との結合を比較したところ、actin 線維との親和性に差が見られなかった。

(3) 形質変換におよぼすニコチンの作用
ニコチンは VSMC の遊走を促進することが知られているが、VSMC が長時間ニコチンに暴露されると形質変換に影響を及ぼすことが予想される。そこで本研究では VSMC の形質変換に対するニコチンの直接的な効果について調べることにした。ヒト大動脈由来の初代培養系 HuAoSMCs に TGF- β を加えてマーカー遺伝子と MAPK の発現量の変化を定量することにした。タンパク質レベルおよび mRNA レベルで、ニコチンの長期投与により合成型のマーカーである myosin II 10 の発現量が増加した。また VSMC の分化マーカーである notch 受容体の発現量が減少した。ウェスタンブロットでは α -actin の発現量がニコチンの添加により 1.58 倍に増加した。高分子量 caldesmon や SM22 のような分化マーカーの発現量がそれぞれ 0.39 倍あるいは 0.74 倍に低下した。またニコチンは p38 MAPK と ERK の活性をそれぞれ 1.3 倍あるいは 1.9 倍増加させた。このことはニコチンへの長期暴露が HuAoSMCs を収縮型合成型へシフトさせたことを意味している。このことから動脈硬化症において VSMC が血管壁のプラークへと遊走する際に、ニコチンが重要な関与をすることを示唆している。

(4) 血管平滑筋細胞の形質変換におよぼす DIF 化合物の効果

DIF (differentiation inducing factor)はキイロタマホコリカビ *Dictyostereum* から単離された分化誘導因子であるが、その後抗がん剤の differentiol と化学構造が似ていることから、抗細胞増殖作用、抗腫瘍作用があることが確認されるようになった。VSMC は FBS 存在下で長期間培養すると形質変換をおこし、平滑筋マーカー遺伝子の発現量が低下し、細胞増殖が活性化されることが報告されている。これは FBS に含まれる PDGF などの種々の増殖因子が、VSMC の形質変換(脱分化)を誘導するためだと考えられる。そこで本研究では DIF 化合物が VSMC の脱分化(収縮型 合成型への変化)を抑制するかどうかについて解析することにした。

平滑筋細胞の形質変換に影響を及ぼす可能性のある DIF 化合物(DIF-1 および DIF-3)をラット大動脈平滑筋の初代培養系に添加し、形質変換の時間変化について解析する方法について検討した。通常の 10 %血清にさらに DIF 化合物を培養液に添加して培養すると、平滑筋マーカータンパク質である α -actin および calponin の発現量が増加した。培養液から DIF 化合物を取り除くとこれらの遺伝子の発現レベルが元に戻り、DIF 化合物の作用に可逆性があることが確認された。また細胞の増殖速度および細胞の形態の観察により、DIF 化合物が血清存在下での試験管内培養において収縮型 合成型への形質変換を抑制する可能性が示唆された。このことから適切な濃度の DIF 化合物存在下では平滑筋細胞が正常な収縮型の状態を維持することが可能になり、種々の実験に適用できることが期待される。一方 p53 遺伝子ノックアウトマウス大動脈由来の AC01 細胞でも同様に DIF 化合物の作用を調べたが、より低い濃度で細胞毒性が見られた。

マウス大動脈由来の VSMC である AC01

株は、培地から FBS を除いてから、PDGF や TGF- β を添加すると数日後に合成型および収縮型に良く似た性質の細胞へと変化する。そこでこのモデル系に DIF-1 あるいは DIF-3 を添加し、細胞の形態変化を観察するとともに、数日後に細胞を回収しウェスタンブロットで平滑筋マーカー遺伝子の発現量を解析した。DIF-1 や DIF-3 は 10~30 μ M の濃度範囲で AC01 細胞の増殖を抑制した。この抑制効果は DIF-1 よりも DIF-3 の方が強かった。DIF-1 や DIF-3 を添加すると平滑筋マーカー遺伝子の α -actin の発現量が増加した、しかし別のマーカー遺伝子である calponin や高分子量 caldesmon については結果にばらつきが多く、発現量が増加するという結論を得るは困難だった。ラット VSMC の初代培養の系では、長期に培養するとマーカー遺伝子である高分子量 caldesmon の発現量が徐々に低下するが、DIF-1 や DIF-3 を添加するとこの低下が抑制された。

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9件)

Suzuki MM, Matsumoto M, Omi H, Kobayashi T, Nakamura A, Kishi H, Kobayashi S, Takagi T., Interaction of peptide-bound beads with lipopolysaccharide and lipoproteins. *J. Microbiol. Methods.*, 100, 2014, 137-141. 査読有

美濃松兼、矢野竹男、三島隆、青木恭彦、大井淳史、炭酸ナトリウム添加による凍結ゴマサバ肉の加熱ゲル形成能の向上, *日本食品工学会誌*, 14, 2013, 29-36. 査読有

Zhang Y1, Kawamichi H, Tanaka H, Yoshiyama S, Kohama K, Nakamura A. Calcium-dependent regulation of the motor activity of recombinant full-length

Physarum myosin., J. Biochem., 152, 2012, 185-190. 査読有

Wang HH, Nakamura A, Yoshiyama S, Ishikawa R, Cai N, Ye LH, Takano-Ohmuro H, Kohama K., Down-regulation of myosin light chain kinase expression in vascular smooth muscle cells accelerates cell proliferation: requirement of its actin-binding domain for reversion to normal rates. J. Pharmacol. Sci., 119, 2012, 91-96. 査読有

Yoshiyama S, Horinouchi T, Miwa S, Wang HH, Kohama K, Nakamura A, Effect of cigarette smoke components on vascular smooth muscle cell migration toward platelet-derived growth factor BB., J. Pharmacol. Sci., 15, 2011, 532-535. 査読有

近藤哲也、鈴木亮、岡垣壮, 平滑筋からの myosin および調節タンパク質の精製法の改良, 三重大学大学院生物資源学研究科紀要, 第 37 号, 2011, 87-97. 査読有

Ooi, A., Okagaki, T., Thermal stability of carp actin in its polymerized form., Fish. Sci.77, 2011, 1053-1059. 査読有

Zhang Y, Nakamura A, Kawamichi H, Yoshiyama S, Katayama T, Kohama K., Calcium regulation of the ATPase activity of Physarum and scallop myosins using hybrid smooth muscle myosin: the role of the essential light chain., FEBS Lett. 584, 2010, 3486-3491. 査読有

大井敦史、田村陽二郎、岡垣壮、マダイミオシン加熱ゲル形成に及ぼすグルコン酸塩の影響、日本水産学会誌, 76, 2010, 1066-1072. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

岡垣壮、西村陽平、磯西啓太、別府はるか、戸澤彩香、大井敦史、コイ筋原線維 ATPase 活性の Ca-感受性に対する C タンパク質の効

果、平成 25 年度日本水産学会秋季大会 2013 年 9 月 20 日-9 月 21 日、三重大学(津市)

中村彰夫、松本篤、王洪輝、謝策、吉山伸司、河原田律子、高顛、石川良樹、小濱一弘、血管平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼのアクチン連関による新しい機能、第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日~23 日、福岡国際会議場(福岡市中央区)

美濃松兼、矢野竹男、三島隆、青木恭彦、大井淳史、冷凍ゴマサバ肉へのアルカリ直接添加による足の増強、平成 24 年度日本水産学会秋季大会 2012 年 09 月 15 日~09 月 16 日、水産大学校(下関市)

吉山伸司、小濱一弘、中村彰夫、ニコチンの血管平滑筋細胞の遊走と遺伝子発現に対する影響、第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 14 日~16 日、国立京都国際会館(京都市左京区)

大井敦史、蛍光消光法によるコイ骨格筋 F-アクチンの構造学的解析、平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 2010 年 9 月 22 日~23 日、京都大学(京都市左京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡垣 壮 (OKAGAKI, Tsuyoshi)
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号: 80185412

(2) 研究分担者

大井淳史 (OOI, Atsushi)
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号: 70203693

(3) 連携研究者

中村彰男 (NAKAMURA, Akio)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30282388