

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590295

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞の脱分化に伴い異常発現するマイクロRNAから動脈硬化症の原因を探る

研究課題名(英文) Exploring the causes of arteriosclerosis from the expressed microRNA by the dedifferentiation of vascular smooth muscle cells.

研究代表者

中村 彰男 (Nakamura, Akio)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30282388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は網羅的遺伝子発現解析の結果からニコチンの暴露がヒト血管平滑筋細胞(HSMCs)の表現型を収縮型から合成型に変化させたことを示しました。HSMCsが合成型に脱分化するに伴い、MAPKシグナル経路が活性化された結果、細胞遊走能が上昇した可能性が示唆された。私たちは、ニコチンが直接、HSMCの血管の中膜から粥状プラークへの細胞遊走を促進している可能性を明らかにした。そして、そのHSMCの脱分化に伴い変動するマイクロRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：We indicated that the exposure of nicotine had changed the human vascular smooth muscle cells (HSMCs) phenotype from contractile-type to a synthetic-like type by the results of the exhaustive gene expression profiling analysis. When the HSMCs were de-differentiated into synthetic phenotype, their migration increases, which might be the result of enhanced activation of MAPKs. We propose that nicotine directly may promote the migration of HSMCs from the tunica media to atherosclerotic plaques in the vascular intima. We have identified a microRNA that varies in accordance with the de-differentiation of the HSMCs.

研究分野：Molecular Pharmacology

キーワード：血管平滑筋細胞 形質転換 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国は深刻な高齢化社会を迎えており、さらに喫煙や食生活の欧米化などによる生活習慣の変化などの影響で、虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化症疾患が増加している。この動脈硬化症の要因の一つとして血管平滑筋細胞の脱分化が注目されている。これはプラーク形成に伴い、通常は収縮型として分化した血管平滑筋細胞が何らかの刺激により収縮型から遊走・増殖型に形質転換して、中膜の平滑筋層からプラーク部分に遊走し増殖するためではないかと考えられている。しかしながらその詳細な分子機構に関しては良くわかっていない¹⁾。一方、喫煙がアテローム性動脈硬化症の危険因子であることから、その疾患メカニズムの解明にマクロファージや血管内皮細胞を用いた多くの研究アプローチが行われている²⁾。喫煙により体内に取り込まれる成分は無数にあるが、主要成分であるニコチンが血管平滑筋細胞への直接作用に関する研究報告は少ない。それはニコチンが循環器系に影響を及ぼすことは古くから知られていたが、血管平滑筋細胞にニコチン性アセチルコリン受容体は見つからず、ニコチンの循環器系への作用は交感神経や血管周囲神経を介しておこなわれるというのが一般的な認識であった為である。ところが、近年ニコチンが血管平滑筋細胞に直接作用している可能性が我々のグループも含めて相次いで報告された^{3),4)}。我々はモルモット脳底動脈由来のGBaSM-4細胞株を用い、ニコチンが $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体を介して誘引物質として働くことを報告した⁵⁾。さらに、GBaSM-4細胞株はニコチンに慢性的に暴露することで遊走能および細胞増殖能が促進する事も報告した⁶⁾。

2. 研究の目的

本研究ではニコチンが分化した収縮型の血管平滑筋細胞をどの様な分子機構で脱分化させるのか？また、脱分化により、どの様なメカニズムで収縮型から増殖・遊走型に形質が変わるのか？この問いに答える為に、ヒト大動脈由来の初代血管平

滑筋培養細胞(HSMC 細胞)を用いて、形質転換を引き起こすニコチンを暴露した際に、変動するマイクロ RNA を含む血管平滑筋分化マーカー遺伝子の網羅的遺伝子解析を中心に行う事で、その分子機構を明らかにする事を研究の目的とする。

3. 研究の方法

3.1 培養細胞と分化培養

ヒト大動脈由来の HSMC 細胞は Cambrex 社から購入した。HSMC 細胞を 231 培地により培養した後、血清を除き、24 時間後に 1 ng/ml TGF- β を加え、48 時間分化させた。分化後、細胞遊走能が最も促進する 0.1 μ M ニコチンを加えて 0 時間 (コントロール)、24 時間、48 時間の細胞をセルスクレイパーで回収し、リアルタイム PCR 用のサンプルとした。

3.2 リアルタイム PCR

全 RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡)を用いて逆転写反応を行い合成した。リアルタイム PCR 反応は、LightCycler SYBR Green 1 Master (Roche Diagnostics 社)を用いて LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社)により測定および解析を行った。得られたデータはサイクル比較法($\Delta\Delta$ Ct 法)により解析し、相対定量を行った。目的遺伝子に対する相対定量値は 18S rRNA との比率で算出した。

3.3 ウェスタンブロッティング

ニコチン暴露 48 時間後の HSMC 細胞を用意し、protease 阻害剤カクテル (Complete, Roche 社)と phosphatase 阻害剤カクテル (PhosSTOP, Roche 社)を含む T-PER Reagent(Thermo Fisher Science 社)を用いて回収後、超音波処理により細胞抽出液を調製した。SDS 電気泳動後、血管平滑筋分化マーカー蛋白質の検出はウェスタンブロッティング法により行った。MAPK、ERK、JNK のリン酸化レベルは、リン酸化特異的抗体を用いてウェスタンブロット法により行った。

3.4 細胞内カルシウム濃度測定

大阪大学の永井健治教授より譲与して頂いた Nano-lantern(Ca^{2+})/pcDNA3 よ り pIRES-GFP-Nano- lantern を作成し、HSMC 細胞 に FuGene6(Roche 社)を用いて導入した。Nano-lantern(Ca^{2+})を導入した HSMC 細胞は 0.1 μM ニコチン存在下および非存在下で 48 時間培養した後 96-well プレートに移した。細胞内カルシウム濃度測定は 0.1 μM ニコチンにより刺激後、直ちに 20 μM の coelenterazine-h を基質として加え、Perkin-Elmer 社の EnSpire により化学発光強度を測定した。ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害剤である 10 μM メカミラミンは 0.1 μM ニコチンの刺激の30分前に投与した。

3.5 網羅的リン酸化プロテオーム解析

抽出全蛋白質溶液に最終濃度が 80%になるようにメタノールを加え、全蛋白質を遠心にて回収した。沈殿を 8 M 尿素溶液に溶解し、100 μg の全タンパク質を還元アルキル化後、トリプシン・リシルエンドペプチダーゼで完全消化した。消化産物はモリス C18 tip により脱塩濃縮後、Phos-tag agarose /C18 二相チップを用いてリン酸化ペプチドを分離濃縮した。Phos-tag agarose /C18 二相チップの素通り画分は MonoSpin チタニア (TiO) によりリン酸化ペプチドを回収した。得られたペプチドは QTrap 4500 LC/MS/MS 質量分析装置 (AB Sciex) を用いてポジティブモード及びプレカーサーイオンスキャンによるネガティブモードにより解析を行った。得られた質量データは Protein pilot (AB Sciex) により解析した。

3.6 培養上清に含まれるマイクロ RNA の解析

HSMC 細胞は血清を除き、24 時間後に 1 ng/ml TGF- β を加え、48 時間分化させた。分化後、0.1 μM ニコチンを加えて細胞遊走能が最も促進する、48 時間の培養細胞上清を 3D-Gene[®] miRNA Oligo chip (東レ(株))にて解析を行った。

3.7 統計学的処理

多群間比較にはボンフェローニ法 (Bonferroni-Dunn post hoc test)、2 群間比較には

スチューデントの t 検定 (Student T test) を用いた。P 値が 0.05 未満を有意とした。

4. 研究の成果(結果)

4.1 血管平滑筋分化マーカー遺伝子の変動

リアルタイム PCR 解析の結果、ニコチン暴露により、収縮型の分化マーカーである myosin II 11 と SM22 の遺伝子発現は 24 時間後にいったん有意に増加するが、48 時間後には myosin II 11、 α -Actin、SM22 は有意に減少し、高分子カルデスモン(H-caldesmon)は減少傾向を示した。遊走・増殖型のマーカー遺伝子である myosin II 10、 β -Actin の遺伝子発現はニコチンの暴露後、時間依存的に有意に増加した。

0.1 μM ニコチンにより暴露により血管平滑筋細胞の細胞遊走および増殖能が促進することを報告した⁸⁾。ニコチンの暴露が HSMC 細胞の分化マーカー遺伝子をどの様に変化するかを調べた結果、ニコチンの投与後 48 時間で収縮型の分化マーカーである myosin II 11、SM22、 α -Actin、H-caldesmon の遺伝子発現が減少することから収縮型の遺伝子発現が低下していると考えられる。しかし、24 時間の場合 myosin II 11 と SM22 の遺伝子発現が一過的に上がるのは TGF- β の作用が遅れて現れているのかも知れない。また、遊走・増殖型のマーカー遺伝子である myosin II 10 や β -Actin がニコチン暴露から 48 時間で増加していることから、ニコチンは血管平滑筋の収縮型から遊走・増殖型に形質転換している可能性が示唆された^{7,8) 9)}。

更に、それぞれの形質転換に特異的なマーカー蛋白質の抗体を用いたウェスタンブロット解析により、蛋白質量を調べた結果、ニコチン暴露後 48 時間には収縮型の分化マーカーである myosin II 11、SM22、H-caldesmon の蛋白質量は有意に減少したが、 α -Actin には有意な変化は見られなかった。それとは反対に遊走・増殖型のマーカーである myosin II 10 は増加傾向を示し、 β -Actin は有意に増加した。

タンパク質レベルの解析においても、48 時間のニコチンの暴露によりアクチン系では遊走・

増殖型の myosin II 11 と β -Actin が増加し、収縮型である myosin II 10 が減少していることから遊走・増殖型に形質転換していると考えられる。通常、myosin や Actin などの構造蛋白質は急速な変化を示さないが、48時間アクトミオシン系の構成成分に大きな変化が現れるのは非常に興味深い。さらに血管平滑筋の分化マーカーである SM22 や H-caldesmon も減少している事はこの形質転換を裏付けている。

4.2 細胞遊走に関わるシグナル解析

次にニコチン暴露 48 時間後の HSMC 細胞における細胞遊走シグナル伝達分子のリン酸化レベルを調べた。P38 MAPK、ERK(1/2)、JNK リン酸化レベルの変化を測定した結果、ERK(1/2)のリン酸化レベルはコントロールと比較して有意に増加した。p38 MAPK と JNK のリン酸化レベルはコントロールと比較して増加傾向を示した。

MAP-kinase 系(p38MAPK、ERK(1/2)、JNK)のシグナル解析データの結果はこれらの MAP-kinase シグナル経路が活性化している事を示しており、細胞遊走に関わる経路が惹起されている可能性が示唆される。これらの結果より、ニコチンは TGF- β で収縮型に分化させた血管平滑筋細胞を遊走・増殖型細胞へと形質転換することにより、細胞遊走能及び増殖能を促進させている可能性が考えられる。

4.3 細胞内カルシウム濃度の変化

HSMC 細胞をニコチンで刺激すると細胞内カルシウム濃度は 0.02mM の ATP で刺激した場合と同様に有意に上昇する。ニコチンで刺激する 30 分前にメカミラミンを前投与しても、カルシウムの上昇には変化がなかった。次に、予めニコチンを 48 時間暴露した HSMC 細胞を再びニコチンで刺激すると細胞内カルシウム濃度は更に有意に上昇した。メカミラミンを前投与するとその増加した一部のカルシウム上昇は阻害される。しかし、完全には阻害されなかった。

4.4 網羅的リン酸化プロテオミクス

ニコチン暴露した HSMC 細胞内でどのような蛋白質がリン酸化されているのかを網羅的に調べる

試みを行った。Phos-tag agarose で単離濃縮したリン酸化ペプチドをイオントラップ型の MS/MS 質量分析装置で解析した結果、細胞遊走や細胞増殖シグナルに関わる蛋白質を含む約 400 のペプチドが特異的にリン酸化されている事がわかった(未発表データ)。Phos-tag agarose と MonoSpin チタニアでは明らかに Phos-tag agarose の方がより多くのリン酸化ペプチドを捕捉していることがわかった。

4.5 脱分化に関わるマイクロRNAの変動

ニコチン暴露した HSMC 細胞で発現が減少するマイクロRNAは miR671 や miR92a など 14 種類が検出された。逆に発現が増加するマイクロRNAは miR27a や miR365 など 33 種類が検出された。これらの中で一部のマイクロRNAを HSMC 細胞に遺伝子導入すると細胞遊走能や増殖能が増加する事がわかった(未発表データ)。ではニコチンはどのようなメカニズムで収縮型から遊走・増殖型への形質転換を引き起こし脱分化するのであろうか? 第一に考えられるのは我々が既に報告した血管平滑筋細胞に発現しているニコチン性アセチルコリン受容体を介したシグナル伝達系が予想される⁷⁾。そこで、ニコチン性アセチルコリン受容体は細胞内カルシウム濃度を上昇させる事から、ニコチンの刺激で細胞内カルシウムが上昇するか否かを調べた結果、HSMC 細胞をニコチンで刺激すると細胞内カルシウム濃度は上昇するが、ニコチン性アセチルコリン受容体の拮抗薬であるメカミラミンではそのカルシウム上昇にはほとんど影響を与えない。ところが、予め48時間ニコチンを暴露した HSMC 細胞ではコントロールの細胞に比べて細胞内カルシウムの上昇は促進され、それはメカミラミンにより部分的に阻害された。これはニコチンの暴露により HSMC 細胞でニコチン性アセチルコリン受容体の発現が上昇することと一致している。しかしながら、少なくともメカミラミンで阻害されない顕著な細胞内カルシウムの上昇が見られる。最近、嗅上皮細胞においてニコチンが Olfactory 受容体に直接作用して細胞内カルシウムを上昇させていることが明らかにされている¹⁰⁾。我々の網羅的遺伝子解析のデータにおい

ても HSMC 細胞にニコチンを暴露すると、Olfactory receptor 2G6 や Olfactory receptor 10A3 がそれぞれ 2.68 および 2.63 倍に発現量が増加している。ニコチンは血管平滑筋細胞においてもニコチン性アセチルコリン受容体以外の受容体を介した新しいニコチンによるシグナル経路が存在するのかもしれない。今後、更に詳細なシグナル解析を検討する必要がある。

我々はニコチンが血管平滑筋に直接作用することにより惹起される血管病に関して、血管平滑筋細胞の細胞遊走や増殖などの表現系の変化としてのフェノーム解析、培養上清のマイクロ RNA を含む網羅的遺伝子解析におけるトランスクリプトーム解析、そしてリン酸化プロテオーム解析とオミックス研究を展開した。得られた基礎データは莫大であり、今後はバイオインフォマティクス的手法を取り入れたドライ解析をもとに個々のマイクロ RNA 分子の薬理学的および生化学的なウェット解析を引き続き行っていく。

<引用文献>

- 1) Witteman, J. C. M, Grobbee, D. E, Valkenburg, H. A. et al. : Cigarette smoking and the development and progression of aortic atherosclerosis; a 9-year population-based follow-up study in women. *Circulation* 1993; 88: 2156-2162.
 - 2) Hopkins, P. Molecular biology of Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2013; 93: 1317-1542.
 - 3) Luozzo, DL., Pradhan, S., Dhadwal, AK et al. Nicotine induces mitogen-activated protein kinase dependent vascular smooth muscle cell migration. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 271-277.
 - 4) Kanda, Y., Watanabe, Y. Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*. 2007; 80: 1409-1414.
 - 5) Li, S., Zhao, T., Xin, H et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit mediates migration of vascular smooth muscle cells toward nicotine. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; 94: 334-338.
 - 6) Yoshiyama S, Horinouchi T, Miwa S et al. Effect of cigarette smoke components on vascular smooth muscle cell migration toward platelet-derived growth factor BB. *J Pharmacol Sci.* 2011; 115(4): 532-535.
 - 7) Thyberg, J., Palmberg, L., Nilsson, J. et al. Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells. On the role of platelet-derived growth factor. *Differentiation*. 1983; 25, 156-167.
 - 8) Owens, GK., Thompson, M.M. et al. Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. Relationship between growth and cytodifferentiation. *J. Biol. Chem.* 1986; 261, 13373-13380.
 - 9) Ueki, N., Sobue, K., Kanda, K. et al. Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84, 9049-9053
 - 10) Bryant, B. Xu, J., Audige, V. et al. Cellular basis for the olfactory response to nicotine. *ACS Chem. Neurosci.* 2010; 17,246-256.
- ## 5. 主な発表論文等
- [雑誌論文] (計 8 件)
1. Yoshiyama, S., Chen, Z., Okagaki, T., Kohama, K., Nasu-Kawaharada, R., Izumi, T., Ohshima, N., Nagai, T., and Nakamura, A. Nicotine exposure alters vascular smooth muscle cell phenotype from a contractile to a synthetic type. *Atherosclerosis* 2014; 237: 464-470 査読有
 2. Suzuki, M.M., Matsumoto, M., Omi, H. et al. Interaction of peptide-bound beads with lipopolysaccharide and lipoproteins. *J. Microbiological Methods* 2014;100:137-141 査読有
 3. 河原田律子, **中村彰男**, 小浜智子, 糖尿病母ラットから産まれた仔の心臓のインスリンシグナリングと魚油の影響, **糖尿病と妊娠**, 2013; 13: 122-126 査読有
 4. Nasu-Kawaharada, R., Nakamura, A., Kakarla, SK. et al. A maternal diet rich in fish oil may improve cardiac Akt-related signaling in the offspring of diabetic mother rats. *Nutrition*. 2013; 29: 688-692. 査読有
 5. Kiboku, T., Katoh, T., Nakamura, A. et al. Nonmuscle myosin II folds into a 10S form via two portions of tail for dynamic subcellular localization. *Genes Cells*. 2013; 18: 90-109. 査読有
 6. Kawamura, K., Takakura, K., Mori, D., Ikeda, K., **Nakamura, A.**, and Suzuki T. Tunicate cytostatic

factor TC14-3 induces a polycomb group gene and histone modification through Ca²⁺ binding and protein dimerization. *BMC.Cell Biol.* 2012; 13: 1-13
査読有

7. Zhang, Y., Kawamichi, H., Tanaka, H. et al. Calcium-dependent regulation of the motor activity of recombinant full-length Physarum myosin. *J. Biochem.*, 2012; **152**: 185-190. 査読有
8. Wang, HH., Nakamura, A., Yoshiyama, S. et al. 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.*, 2012; **119**: 91-96 査読有

(学会発表) (計 14 件)

1. Nakamura, A., Chen Z., Yoshiyama, S., Kawaharada, R., Kohama, K. Nicotine exposure alters Human Vascular smooth muscle cell phenotype from a contractile to a synthetic type. *15th IUBMB*, Taipei, **Taiwan**, (2014 年 10 月 21 日)
2. Nakamura, A., Chen Z., Kawaharada, R., Yoshiyama, S. The Molecular Mechanism for Remodeling of Human Aorta Smooth Muscle Cell Exposed to Nicotine. *18th Internat. Vascular Biology Meeting*, Kyoto **Japan**, (2014 年 4 月 14 日)
3. Nakamura, A., Kawaharada R., Masuda H., and Nishiyama, M., Effect of EPA on cardiac muscle cell of infants of diabetic mother rats. *38th FEBS Congress*, St. Petersburg, **Russia**, (2013 年 7 月 9 日)
4. Nakamura, A., kawaharada, R., Yoshiyama, S., Takazawa, K., Shimizu, H., Masuda, H., Inoue, N. and Inoue, T. Antihypertensive effect and relaxant activity of a post-fermentation tea extract., *The 5th International Conference on O-CHA Culture and Science*, Shizuoka, **Japan**, (2013 年 11 月 7 日)
5. Nakamura, A., Matsumoto A., Xie C., Yoshiyama, S. Kawaharada-Nasu R., and Gao Y., Role of non-kinase activity of vascular smooth muscle myosin light-chain kinase in regulation contraction and migration. *The 10th Korea- Japan Joint Symposium on Vascular Biology*, Tokushima, **Japan**, (2012 年 12 月 7 日)
6. Nakamura, A., Matsumoto A., Xie, C., Yoshiyama, S., Kawaharada-Nasu R., Gao Y., and Kohama K. Role of non-kinase activity of myosin light-chain kinase in regulating vascular smooth muscle contraction and migration. *12th Meeting of the European Calcium Society*, Toulouse, **France** (2012 年 9 月 10 日)
7. Nakamura, A., Matsumoto A., Yoshiyama S., Xie C., Kawaharada R., Gao Y., and Kohama K. Novel calcium regulation of actin-binding activity of smooth muscle myosin light-chain kinase. *Congress 22nd IUBNB - 37th FEBS*, Sevilla, **Spain** (2012 年 9 月 5 日)
8. 吉山伸司, 陳震一, 西山正彦, 和泉孝志, **中村彰男**. 血管平滑筋細胞に対するニコチンの分化・脱分化作用に関する解析. **第 21 回日本血管生物医学学会学術集会**, 大阪 (2013 年 9 月 27 日)
9. Chen Z., Yoshiyama S., Izumi T., Nishiyama M., Nakamura A. Genetic analysis of vascular smooth muscle cells exposed to nicotine. **第 86 回日本生化学会大会予稿集**, 横浜 (2013 年 9 月 11 日)
10. Yoshiyama, S., Chen, Z., Kohama, K. and Nakamura, A. Genetic analysis of vascular smooth muscle cells exposing nicotine. **第 86 回日本薬理学会年会**, 福岡 (2013 年 3 月 21 日)
11. Takano-Ohmuro, H., Wang, H., Nakamura, A., and Yoshiyama, S., Ishikawa, R., Na, C., Ye, L., Kohama, K. Actin-binding domain of myosin light chain kinase in the proliferation of vascular smooth muscle cells. **第 86 回日本薬理学会年会**, 福岡 (2013 年 3 月 21 日)
12. Nakamura, A., Matsumoto, A., Wang, H., Ce, X., Yoshiyama, S., Kawaharada, R., Gao, Y., Ishikawa, R., Kohama, K. A novel function of myosin light chain kinase in vascular smooth muscle. **第 86 回日本薬理学会年会**, 福岡 (2013 年 3 月 21 日)
13. **中村彰男**, 松本篤, 吉山伸司, 謝策, 河原田律子, 高穎, 小濱一弘, 妊娠糖尿病ラットから生まれた子供のインシュリンシグナリング解析. 福岡, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡 (2012 年 12 月 11 日)
14. 吉山伸司, 陳震一, **中村彰男**, 血管平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼのカルシウム依存性アクチン連関における非キナーゼ活性の役割. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡 (2012 年 12 月 11 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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