

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590462

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞の多彩な形質転換を制御するリゾフォスファチジン酸シグナリングの解析

研究課題名(英文) Regulation of vascular smooth muscle phenotypes by lysophosphatidic acid receptor signaling

研究代表者

加藤 誠也 (Kato, Seiya)

久留米大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60268844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化病変で酸化LDLを起源として合成されるリゾフォスファチジン酸LPAは血管平滑筋細胞の多彩な形質転換を誘導する因子として病変形成に関与する。本研究では培養平滑筋細胞で従来知られていたEDG型レセプターアイソフォーム(LPA1-3)よりも非EDG型のレセプター(LPA4-6)の発現レベルが相対的に高く、非EDG型のレセプター下流ではEDG型レセプター下流とは異なる様式の転写因子活性の調整を介して細胞機能の調整に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a promoting factor of various aspects of phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells, which has been known to be synthesized in the atheromatous lesions from oxidized low-density lipoprotein. Present study may suggest that the expression levels of non-EDG (endothelial differentiation gene) family receptors (LPA4-6) are relatively larger than those of EDG family receptors (LPA1-3). At the down-stream of non-EDG family receptors, differential manner in the activation of transcriptional factors from EDG family receptor activations, may contribute to the regulation of vascular smooth muscle functions.

研究分野：病理学

キーワード：血管平滑筋細胞 形質転換 動脈硬化 リゾフォスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 粥状動脈硬化の発症過程には血管平滑筋細胞の形質転換機序が関与している
急速な高齢化の進む我が国でがんと並び年間約 30 万人の死亡数におよぶ心血管病、脳卒中の大部分は粥状動脈硬化の合併症である。血管平滑筋細胞は血管壁における最大量の構成細胞であり、筋細胞としてトーンスの維持を果たすだけでなく、血管壁傷害に反応した多彩な形質転換を示し病理学的変化の成立に重要な役割を果たす。1980 年代、電子顕微鏡などによる形態学的観察より培養平滑筋細胞における収縮（静止）型から増殖（合成）型への可逆的形質転換が提唱され、当時、臨床的に大きな課題であった血管形成術後の再狭窄の主因とされた事も追い風となり、多くの研究者が形質転換機序の探索に参画した。ところが、知見が集積するに伴い平滑筋細胞は従来の収縮型、増殖型と言う古典的形質転換の概念には収まらない多彩な形質、たとえば泡沫化（脂肪化）、老化型、骨化型形質が明らかになってきた。今世紀に入ると動脈硬化の発症、進展について、血管壁局所だけではなく全身性も含めた炎症として捉えようとする説が主流となったが、平滑筋細胞がどのような機序で炎症型形質などの多彩な形質を発現し、病変形成やプラーク破綻等の合併症をもたらすのか、十分に解明されていない。

(2) 動脈硬化病変のリゾホスファチジン酸 (LPA) は平滑筋細胞の形質転換因子である。動脈硬化では自覚症状に乏しい慢性微小炎症が長期にわたり病変形成に関与すると予想されているが、起因刺激として重視されているのが、血管壁に蓄積する脂肪、特に悪玉コレステロールとして名高い低比重リポ蛋白 (LDL) である。酸化 LDL は平滑筋の産生するプロテオグリガンとよく結合するが、リン脂質であるリゾホスファチジルコリンを多く含み、これは血中や病変部に存在するリゾホスフォホリパーゼ D (オートタキシン) の作用でリゾホスファチジン酸 (LPA) に転ずる。LPA は多彩な生理活性を有する脂質メディエーターで、平滑筋細胞においても増殖、脱分化、抗アポトーシス、遊走能亢進に加えてケモカインの MCP-1 の発現など炎症型形質発現に作用する。すなわち LPA は平滑筋細胞の形質転換因子として動脈硬化病変の形成に関与している可能性が高い。

(3) 平滑筋細胞の形質転換機構における LPA シグナリングの全容は明らかではない。LPA には低分子量 G 蛋白に共役した 7 回膜貫通型レセプターが存在する。LPA1-3 は EDG (Endothelial Differentiation Gene) ファミリーに属し、種々の細胞への作用の多くが化学的に合成された阻害薬 Ki16425 に感受性である事などから、細胞内のシグナリングの主経路はこれらのレセプターに依存する

ものと思われてきた。ところが近年、EDG ファミリーとは遺伝子学的系譜を異にする新規レセプター LPA4 (P2Y9/GPR23) が同定され、現在まで LPA5 (GPR92)、LPA6 (P2Y5) の非 EDG 型レセプターが判明している。たとえば LPA4 欠損マウスは野生型マウスより骨密度が高く、またラット neuroblastoma 細胞株での LPA4 の過剰発現は G 蛋白である Rho 経路を介した神経突起の退縮に関与するが、この際、LPA1 下流のシグナリングと拮抗して生理的調整機構を示す可能性など生体や培養細胞での機能発現が指摘されている。しかしながら、血管平滑筋細胞においては非 EDG 型 LPA レセプターの作用機序、細胞形質への影響はほとんど検証されていない。血管平滑筋細胞の形質転換における LPA の役割についての過去の研究は主として増殖型 収縮型の古典的形質転換系を対象とした成果であり、実際の動脈硬化病変で平滑筋細胞の示す多彩な形質転換形成過程や各種の特異的形質に対する LPA 作用については未だ良く判っていない。生活習慣病、脂質代謝異常症により動脈硬化病変には大量の LPA 産生系が予測されており、LPA を介した血管平滑筋細胞の形質転換機構解明は、動脈硬化性疾患の病因病態論の展開のみならず治療法の開発へつながる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は「多彩な形質を発現する平滑筋細胞の in vitro 培養系においてリゾホスファチジン酸 (LPA) の作用を明らかにすることである。具体的な課題としては、多彩な細胞形質を示す平滑筋細胞の in vitro 培養系の樹立、各細胞形質発現過程における EDG、非 EDG 型 LPA レセプター発現様式の検証、平滑筋細胞における LPA (18:1) の効果の検証、そして細胞内シグナリング経路活性化様式の検証（特に各種 G 蛋白下流のシグナリング活性化）そして LPA レセプター特に非 EDG 型レセプターである LPA4 利用度の変化が細胞形質変化に与える影響の検証があげられる。

3. 研究の方法

(1) 血管平滑筋細胞 in vitro 培養系の樹立
Wistar 系ラットの胸部大動脈を無菌的に採取し酵素法、Explant 法にて平滑筋細胞の初代培養を行い、hills and valley の特徴的な配列と蛍光免疫染色にて平滑筋アクチン SMA の発現を確認した。15 継代未満のものを本研究に用いた。0.5% 血清添加群を静止型形質、10% 血清添加群を増殖形質モデルとし、各種濃度の LPA (18:1) 及び PDGF (10ng/ml) で刺激した。なお LPA1-3 の特異的阻害薬として Ki16425 (1-10uM) を適宜添加した。

(2) 細胞形質と LPA レセプターの発現評価
増殖能評価（細胞数計測と MTT assay、細胞死は TUNEL 法で計測）、収縮蛋白発現量（SMA

に対する Western blot、蛍光免疫染色) 炎症性形質については Fluorescent probe(CM-H2DCFDA)による細胞内酸化ストレスの評価や NADPH oxidase 発現(RT-PCR)を指標とした。LPA レセプター(LPA1-6)の発現 profile には real-time PCR 法を用いた。

(3) LPA レセプター下流のシグナリング解析

Rac-1 activity (pull down assay)

低分子量 G 蛋白下流で作用する転写因子活性の評価

LPA 添加時の Rac-1 活性については市販の kit を用いた pull down assay を行った。また LPA の下流では低分子量 G 蛋白のうち G12/13 が Rho/Rock 経路、Gq が PLC (phospholipase C) から IP3(Inositol trisphosphate)や PKC(protein kinase C)に至る経路、Gi が Ras/MAPK(Mitogen-activated protein kinase)や PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)/Akt 経路、そして Gs が cAMP 依存性に活性化される経路を担うこと知られている。これらの経路が更に下流において活性化する SRF-RE、NFAT、AP-1、SRE、CRE の各転写因子活性について Dual luciferase 法で検討した。また炎症性マーカーとして NFkB 活性をあわせて検討した。すなわち培養平滑筋細胞に lipofectamin2000 を用いて各転写因子の既知プロモーターエレメント(CRE, NFAT-RE, NFkB, SRE, SRF-RE, AP-1)挿入ホタルルシフェラーゼベクター(pGL4)を遺伝子導入、ルミノメーターを用いてレポーター活性を測定した。また HSV-TK 汎用プロモーターを有する pRL-TK ウミシイタケルシフェラーゼベクターを内部標準として用いた。

(4) LPA レセプター(特に LPA4 利用度の変化)が細胞形質変化に与える影響

pCMVGFPLPA4 (Origene)ないし発現カセットを非増殖性 adenovirus vector (dl7001)を移植したベクターを考案し平滑筋細胞の形質変化の検討を試みた。

4. 研究成果

(1) LPA の培養平滑筋細胞形質への影響

LPA(18:1)は 10nM~1microM の範囲で血清無添加群の約 1.5 倍程度の緩やかな増殖促進効果を示し(細胞数計測、MTT assay) 蛍光免疫染色で観察した 100nM 添加時の平滑筋アクチン発現量も低下していた事より LPA は静止型平滑筋から増殖(合成)型への転換因子である事を確認した。なお 10microM の高濃度では増殖刺激効果は明らかではなく、僅かながら TUNEL 陽性細胞や Caspase-3 の断片化が増加する傾向が見られた。このため以下の実験では 100nM~1microM の LPA 刺激を用いた。この濃度の LPA 刺激は同時に DHE 染色や Fluorescent probe(CM-H2DCFDA)を用いて測定した細胞内酸化ストレス(ROS)を亢進させ、RT-PCR 法では細胞膜結合型 NADPH oxidase (p22phox, gp91phox)の発現増加を導き、す

なわち LPA による静止型から合成型への形質転換は細胞内酸化ストレス亢進を伴う炎症型形質の発現ともリンクしている事が推定される。ケモカインである MCP-1 も LPA によって強く誘導された。一方、炎症性転写因子である NFkB の活性は PDGF(10nM)添加 24 時間後では約 1.8 倍を示し、LPA(1microM)では約 1.4 倍程度であった。したがって、いくつかの外因性増殖刺激が静止型から合成型への古典的形質転換に伴い炎症性形質発現の誘導にも作用している可能性がある。

(2) 血管平滑筋細胞における LPA レセプターの発現

Real-time PCR を用いると静止型平滑筋細胞における LPA1 の発現を 1 とした場合の LPA2-6 の発現レベルはそれぞれ 0.14, 0.51, 3.8, 0.4, 11.6 倍であった。なお同じ条件下で合成型平滑筋細胞での LPA1-6 の発現はそれぞれ 1.8, 0.5, 1.2, 3.9, 0.7, 15 倍であった。すなわちいずれの形質を発現する平滑筋細胞においても LPA レセプターの発現は EDG 型(LPA1-3)よりも非 EDG 型が優位であり、形質転換は各アイソフォームのレセプターの発現量を底上げするものの各アイソフォームの発現プロファイルには影響しなかった。冠動脈病変組織を用いた免疫染色においては病変部に強いリゾホスホスホリパーゼ D(オートタキシン)の発現が見られ、中膜平滑筋層やプラークを被う内膜平滑筋層に LPA4 発現が見られており、一方、LPA1 の発現に乏しかった事も含め、LPA4 ないし非 EDG 型レセプターを介した経路が平滑筋の細胞機能のより重要な制御因子としての役割を予感させる。なお本研究では主な対象とはしなかったが、平滑筋細胞で最も相対的な発現レベルの高い LPA レセプターアイソフォームは LPA6 であり、形質転換における LPA6 経路の意義について更なる研究の展開が望まれる。

(3) 培養平滑筋細胞の LPA 下流での転写因子活性の変化

既に述べたようにいくつかの系では非 EDG 型レセプターは既知の EDG 型レセプター経路の調節(制御)系として作用している可能性が指摘されている。たとえばアデニル酸シクラーゼ下流で転写因子 CRE の活性化に導く経路は LPA4 の下流に特徴的であろうと予測されているが、実際に対照として用いた 293 細胞では LPA 添加のみでは僅かであった CRE の活性化が EDG 型レセプター阻害物質 Ki16425 添加により約 3 倍程度に亢進しており、定常状態では EDG 型レセプター経路によって非 EDG 型レセプター経路による形質発現が抑制されている可能性はある。ところが培養平滑筋細胞では CRE に関してはこのような Ki16425 添加時の活性促進は観察されなかった。今回、検討した転写因子の中では NFAT が LPA 添加時で 1.4 倍、LPA+Ki16425 で 1.9

倍の活性化を示し、Ki16425 添加による活性レベルの増大は有意であった。同じく PLC (phospholipase C) の下流で活性化される AP-1 についてはこのような傾向は明らかではなかった。したがって、EDG 型(LPA1-3)および非 EDG 型レセプター(LPA4-6)の下流で LPA 作用の調整されるメカニズムは少なくとも培養平滑筋細胞においては、当初、予測したように各レセプターアイソフォームがどの種類の低分子量 G 蛋白を刺激するかと言うレベルではなく、ある G 蛋白 (NFAT と AP-1 を伴に活性化に導くとされるのは Gq) が活性化された下流のレベルで行われている可能性が示唆される。Gq の下流で活性化される PLC (phospholipase C) は IP3 (Inositol trisphosphate) を介して細胞内カルシウムイオン濃度を増加させ NFAT 活性化を導き、一方ではジアシルグリセロール (DAG) や PKC (protein kinase C) の活性化を経て AP-1 の活性化を導くとされるため、LPA のインプットを受けて活性化した平滑筋細胞では各種の低分子量 G 蛋白の活性化を受けて、より下流のレベルで細胞機能制御を導く転写活性の変化を生じているものと思われた。なお今回の実験条件下では PDGF で約 2.5 倍に増強する SRE の活性化は LPA では見られず LPA が血清や PDGF に比べて増殖型形質への誘導作用が穏やかであった事に関連するものと想像される。

(4) LPA4 過剰発現系の試み

CMV プロモーターの制御下に LPA4 ないし対照として bacterial beta-glucuronidase を発現する第 1 世代 adenovirus vector によって平滑筋細胞の形質への影響を検討する系を試みたが、安定した LPA4 蛋白の発現を得ることが困難であった。予備的な実験では LPA4 発現細胞における増殖能の低下が見られたが (LPA 刺激で約 50%、10% 血清刺激で約 60% の減少、血清には LPA も含まれている事が知られている) 結論を得るためには更に検討が必要である。課題としては LPA レセプターアイソフォームの発現を導くために有効な発現プロモーターの利用、LPA4 発現の確認に用いる特異性の高い抗体の開発が望まれる。今回の研究をサポート頂いた文部科学省、日本学術振興会に深謝致します。

< 引用文献 >

Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J, LPA receptors: subtypes and biological actions, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50 巻, 2010, 157-86

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Aoki Y, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Yasuoka S, Anegawa T, Iwamoto Y, Uchiwa

H, Fukuda K, Kage M, Kato S, Fukumoto Y, Imaizumi T, Large blood pressure variability aggravates arteriosclerosis and cortical sclerotic changes in the kidney in hypertensive rats, *Circ J*, 査読有, 2014, 78 巻, 2284-2291, Doi: 10.1253/circj.CJ-14-0027

Takaya Nakanishi, Seiya Kato, Impact of diabetes mellitus on myocardial lipid deposition: an autopsy study, *Pathology Research and Practice*, 査読有, 2014, 210 巻, 1018-1025, Doi: 10.1016/j.prp.2014.04.008.

Lin Yanhui, Seiya Kato, Type II interleukin-4 receptor-mediated anti-inflammatory response in Mm1 and J774.1 macrophages, *Ryukyu Medical Journal*, 査読有, 2013, 32 巻, 69-78

Matayoshi S, Chiba S, Lin Y, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Suzuki M, Kato S. Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 査読有, 2013, 42 巻, 1560-1568, Doi: 10.3892/ijo.2013.1849.

[学会発表] (計 3 件)

Yanhui Lin, 加藤誠也, マクロファージ細胞株 Mm1 及び J774.1 における II 型 IL-4 受容体を介した抗炎症作用について, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24 日 ~ 26 日 (広島国際会議場, 広島県広島市)

Yanhui Lin, 千葉俊明, 新垣和也, 松本裕文, 又吉 宣, 仲西貴也, 大島孝一, 加藤誠也, 受容体選択的 IL-4 変異体による血管壁細胞の形質転換と動脈硬化病変の制御, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 6 日 ~ 9 日 (ロイトン札幌, 北海道札幌市)

又吉 宣, 千葉俊明, Lin Yanhui, 新垣和也, 仲西貴也, 松本裕文, 加藤誠也, 喉頭扁平上皮癌細胞におけるリゾフォスファジン酸受容体 LPA4 遺伝子導入の効果, 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 6 日 ~ 9 日 (ロイトン札幌, 北海道札幌市)

6 . 研究組織

研究代表者

加藤 誠也 (KATO SEIYA)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

(平成 24 年度 ~ 平成 25 年度)

久留米大学・医学部・非常勤講師

(平成 26 年度)

研究者番号: 60268844