プロテインキナーゼ C による 培養ヒト血管内皮細胞の増殖制御機構

Cell Growth Regulation through the Protein Kinase C Pathway in Cultured Human Vascular Endothelial Cells

国立循環器病センター研究所

小坂 知也・笹栗 俊之・全 勝弘
益田 順一・下門顕太郎・緒方 絢

National Cardiovascular Center Research Institute. Chiya Kosaka,
Toshiyuki Sasaguri, Katsuhiko Zen, Junichi Masuda, Kentaro Shimokado,
and Jun Ogata

〔緒 言〕

内皮細胞は血管の内腔を一層性に被覆して、血液成分と血管壁を隔てるバリアーとしての機能を果たしている。種々の原因により内皮が傷害されるとこの機能が失われ、血漿成分や血球が血管壁へ浸潤したり、内皮の剝離部分に血小板が粘着・凝集する。このような変化が増殖因子やサイトカインの産生・分泌をもたらして内膜肥厚の引き金になるという考えが、Ross により提唱された傷害反応説である¹⁾。実際にヒト冠動脈や高脂血症動物の粥状硬化初期病巣において、内皮細胞が脱落して血小板が粘着している電顕像が観察されており、内皮の剝離とその再生が動脈硬化巣の発生・進展に重大な影響を及ぼすことが示唆されている。内皮細胞の増殖は内膜修復にとって必須であるため、その制御機構の解明は病変の進展を阻止するための治療の観点からも重要と考えられる。

〔目 的〕

細胞増殖を促進(または抑制)する増殖因子・サイトカインがこれまでに数多く知られているが、その多くは G₁ 期に作用し DNA 合成(S 期)の開始を決定づける。これら諸因子がその情報を核に伝える経路については、数多くの研究がなされているにも関わらず、まだ大部分不明と言ってもよい。しかし今日、G₁ 期から S 期への移行の制御機構は以下の様になり明らかになってきた。

細胞周期の進行はサイクリンと呼ばれる発現動態のそれぞれ異なる一連のタンパク質によって制御されている²⁾。そのうちサイクリン A (CycA) は G₁ 後期より S 期にかけて発現し、酵母の細胞分裂を制御する因子として同定された Cdc 2 キナーゼの関連遺伝子産物 Cdk 2 (プロテインキナーゼ活性をもつ) と結合してこれを活性化する。そしてこの Cdk 2 キナーゼが、何らかの基質をリン酸化することによって、G₁/S 移行や DNA 合成を促すと考えられている³⁾。CycA の発現が DNA 合成に先行すること、

CycA に対する抗体やアンチセンス mRNA を細胞に注入すると DNA 合成が阻害されること、さらにこのような細胞に CycA 蛋白を注入すると DNA 合成が再開することなどから、CycA の発現は G₁/S 移行の単なる随伴現象ではなく必須の要素と考えられる⁴⁾⁵⁾。

一方、その欠失が網膜芽細胞腫の病因とされる癌抑制遺伝子、RB 遺伝子の産物である pRB も、G₁/S 移行の制御に関わると言われている。pRB の機能はリン酸化によって制御されており、低リン酸化状態の pRB は G₁/S 移行を抑制しているが、リン酸化を受けるとその抑制能が失われ S 期への移行が起こる。この機序に関しては、pRB がリン酸化されると転写因子 E2F との結合能を失ない、遊離した E2F が c-Myc・Cdc 2・チミジンキナーゼ・DNA ポリメラーゼ α などの転写を亢進して、ついには DNA 合成が開始されるのではないかと推定されている⁶⁾。興味深いことに、in vitro では pRB は Cdk 2 キナーゼの基質となることから、G₁/S 移行に際して pRB をリン酸化するのは CycA によって活性化された Cdk 2 である可能性も示唆されている⁷⁾。(ただし最近では pRB の関連タンパクである p107 の方が、G₁/S 制御にとって pRB よりむしろ重要な役割を担っているとも言われる⁸⁾。)

増殖因子の受容体からこれら細胞周期制御因子への情報伝達は、受容体の自己リン酸化に引き続く種々のプロテインキナーゼ (Raf-1・MAP キナーゼ・S6 キナーゼなど) の活性化によるのではないかと推察されている。一方、受容体刺激に伴って、ホスホリパーゼ C により膜リン脂質が水解されジアシルグリセロール (DAG) が産生されるため、プロテインキナーゼ C (PKC) が活性化されると考えられる⁹⁾。しかしながら細胞増殖に対する PKC の役割については、まだ一定した見解が得られていない。そこで我々は、内皮細胞の増殖に対する PKC 活性化の効果を観察すると同時に、上記の様な細胞周期

制御因子に対するその効果を検討することにより、PKC を介する内皮細胞の増殖制御機構の解明を試みた。

[方法と結果]¹⁰⁾

ヒト臍帯静脈より単離した内皮細胞を無血清培地で48時間培養してG₀に同調させ、10ng/mlの塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)により増殖を刺激した。Phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA)をbFGF刺激後8時間で加えたところ、³Hチミジンの取り込みにより評価したDNA合成は濃度依存性に抑制された。その抑制率は10nMで最大(>95%)であった。また同様の濃度依存性でPMAは細胞数の増加も抑制した(図1)。これらの抑制効果は、あらかじめPMA(1μM)で24時間処理してPKCを枯渇させた細胞では完全に消失したことから、PKC依存性と考えられた。なお³H PMA結合能のScatchard解析では、1.25-25nMの範囲で結合親和性は単一であった。また膜透過性の合成DOG, 1, 2-dioctanoylglycerol (DOG)をbFGF刺激後8時間から16時間まで1時間毎に投与したところ、やはり濃度依存性にDNA合成を抑制し、PKCを枯渇させた細胞ではこの効果は著明に減弱した。以上より、内皮細胞にはPKCを介する増殖抑制機構が存在し、PMA処理によりダウンレギュレーションを受けるPKC分子種がこれに関与することが示唆された。

次にこの抑制機構の解明を試みた。bFGF刺激後、異なる時間でPMAを投与したところ、8時間で投与した時の抑制効果が最大であり、以後の投与では速やかにその効果が失われた。³Hチミジンの蓄

図1 内皮細胞の増殖に対するPMAの効果

G₀に同調させた細胞(8×10³個)をPMA存在下に仔牛血清(20%)とbFGF(10ng/ml)で刺激し、72時間と96時間で回収してコーンターカウンターで計数した。培地とPMAは48時間で一回交換した。

積と比較すると、刺激後8時間はG₁後期に当たる。このことはG₁後期に存在する何らかの機構をPKCが抑制することを示している。前述の様にCycAはG₁/S移行の鍵と言われているが、内皮細胞でCycAの発現動態を観察すると、mRNA・蛋白ともにG₁後期より発現し始め、S期の進行に伴い増加した。このようにPMAによる抑制効果が最大の時点がCycAの産生開始時期と良く一致する。そこで、PKCがCycAの発現を制御する可能性を考え、CycAの発現に及ぼすPKC活性化の効果を調べた。

CycA蛋白は、Nonidet P-40(0.5%)を含む緩衝液中で細胞を超音波破碎して得た上清からウェスタンブロットで検出した(図2a)。bFGF刺激後8時間でPMAを添加すると、以後のCycA蛋白の発現が著明に抑制された。PMA添加後少なくとも16時間、この効果は持続した。この効果はPMA濃度依存性であり10nMではCycAはほとんど検出できなかった。またPKCの枯渇によりこの抑制効果は消失した。次にノーザンブロットでCycAの遺伝子発現に対するPKC活性化の効果を検討した(図2b)。CycAのmRNAの発現はPMAにより著明に抑制され、PKCの枯渇によりこの効果は消失した。さらに核run onアッセイにより、このmRNAの減少は転写の抑制によることが明らかになった。なおDOGの反復投与によってもCycA蛋白・mRNAの

図2 CycAの発現に対するPMAの効果

G₀の細胞をbFGFで刺激し8時間後にPMA(10nM)を加えた。PMA(1μM)で24時間前処理してPKCを枯渇させた細胞についても、PMA除去後に同様の実験を行った。(a) bFGF刺激後20時間で調製した細胞抽出液から、抗ヒトCycAモノクローナル抗体(C160)を用いたウェスタンブロットでCycA蛋白を検出した。(b) bFGF刺激後16時間でRNAを抽出し、ノーザンブロットでCycA遺伝子の発現を調べた。

発現抑制は認められ、これらの効果の濃度依存性も増殖抑制効果のそれとほぼ一致した。

次に pRB のリン酸化に及ぼす PKC の効果を検討した。pRB はリン酸化により SDS-PAGE の泳動度が変わり、低リン酸化状態の pRB は 110 kDa、リン酸化 pRB は 112-114 kDa のバンドとして観察される。静止期の細胞では、pRB はその殆どが低リン酸化状態（活性型）であるのに対して、S 期には不活性型のリン酸化 pRB が増加する。しかし PMA を投与した細胞では、そのリン酸化が著明に抑制された（図 3）。

以上の増殖抑制効果に関与する PKC 分子種を検討するため、分子種特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行なったところ、 $\alpha \cdot \epsilon \cdot \zeta$ 型の発現が認められた（図 4）。

〔考 察〕

PKC を活性化すると内皮細胞の増殖と CycA の発現が強力に抑制された。細胞増殖抑制と CycA 発現抑制の PMA/DOG 濃度依存性が一致すること、最大の増殖抑制効果が得られる時点と CycA の発現開始がほぼ一致することなどから、PKC による増殖抑制は CycA の発現抑制を介する現象である可能性が高いと考えた。また PKC は pRB のリン酸化も抑制した。Cdk 2 が pRB をリン酸化するという仮説が正しいとすると、これは CycA の発現抑制を介した Cdk 2 キナーゼ活性の低下を反映するものかもし

れない。増殖シグナルの伝達路における PKC の作用点については、CycA 転写の上流にあること以外は現在のところ不明である。しかし PKC の作用時点が CycA の発現と一致するという我々の観察や、 α 型を含む PKC 分子種のあるものは核へ移動する¹¹⁾ という報告から考えると、PKC は CycA の転写因子もしくはそれに近い機構を標的として作用し、CycA の転写を直接的に制御しているのかも知れない。

血管平滑筋細胞でも PKC による G_1/S 抑制¹²⁾ とともに CycA の発現抑制が認められる（未発表）。平滑筋細胞が G_1 後期で発現している PKC 分子種も $\alpha \cdot \epsilon \cdot \zeta$ 型であり、その内おそらく α ないし ϵ 型が増殖抑制効果に関与していると思われる¹²⁾。しかし PKC による増殖抑制効果は血管壁細胞にとどまらず、種々の細胞において報告されている。我々は、この機構は細胞種の違いを越えるかなり普遍的なものではないかと推察している。言うまでもなく、細胞増殖とくに G_0 から G_1 への移行は PKC 経路により促進されるという考えがある。それを否定するものではないが、内皮細胞における観察では G_1/S 移行のみならず細胞数増加に対する PKC 活性化の効果も抑制的であった。ただし我々の最近の検討によ

図 3 pRB のリン酸化に対する PMA の効果

bFGF 刺激後 8 時間で PMA (10nM) を加え、20 時間で細胞抽出液を調製した。抗ヒト pRB モノクローナル抗体 (C36) で免疫沈降し、別の抗 pRB 抗体 (PMG3-245) を用いてウェスタンブロットを行なった。

図 4 内皮細胞の PKC 分子種

対数増殖期の内皮細胞から可溶性分画を調製し、PKC の各分子種に特異的な抗体 ($\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ 型は各々 MC-3a・MC-2a・MC-1a, $\delta \cdot \epsilon \cdot \zeta$ 型は GIBCO BRL 社のポリクローナル抗体) を用いてウェスタンブロットを行なった。

図 5 PKC による内皮細胞増殖の制御機構

実線は促進経路、破線は抑制経路を表す。略号：TK, protein tyrosine kinase; PI-3K, phosphatidylinositol 3-kinase; GAP, GTPase activating protein; PIP₂, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate; PC, phosphatidylcholine; PLA₂, phospholipase A₂; PLD, phospholipase D; AA, arachidonic acid; lyso PC, lysophosphatidylcholine; PA, phosphatidic acid. 他は本文参照。

ると、 G_1/S 移行の抑制機序とは独立して、 G_2/M 移行も PKC を介して抑制されるようである (未発表). したがって細胞数増加の抑制には G_2/M 阻害も関与している可能性がある.

増殖因子による PKC 活性化は、他の経路も指摘されているが、少なくとも一部は PLC γ を介して起こると考えられる. しかし PLC γ を過剰発現させた細胞ではリン脂質代謝が亢進するのにも関わらず増殖は影響を受けないこと¹³⁾, あるいは増殖因子受容体の変異により PLC γ を介する経路を阻害しても増殖は妨げられないこと¹⁴⁾⁻¹⁶⁾などは、PKC 経路が増殖にとって必須のシグナルではないことを示唆する. ただし後者については逆の報告もあるので結論づけるのは時期尚早であるが¹⁷⁾.

PKC を介した増殖抑制機構の生理的な意味は何か. これが正の増殖シグナルに対する制動装置である可能性は高いと思われる. そのほか推測の域を出ないながらも、増殖抑制性サイトカインの情報伝達にこの機構が関与する可能性が挙げられる. 血球細胞の増殖を抑制する IFN α/β ・TGF β ・IL-6 が CycA の発現を抑制すること¹⁸⁾や、TNF α ・IFN γ がサイクリン D $_1$ の発現を抑制すること¹⁹⁾が報告されている. また TGF β は Cdc 2 の活性や pRB のリン酸化も抑制する^{20) 21)}. このうち IFN- α は DAG の産生を刺激するらしく、PKC 依存性に作用を発揮する可能性がある²²⁾. 我々の検討では、TGF β や IFN γ による増殖抑制効果は PKC を枯渇させた細胞でも残存していた (未発表). 一方、プロスタサイクリンや心房性利尿ホルモンなど環状ヌクレオチド産生性の諸因子は細胞増殖を抑制すると言われるが、プロスタグランジン E $_2$ や 8-bromo-cAMP はサイクリン D $_1$ の発現を抑制する¹⁹⁾. したがって PKC と cAMP 依存性キナーゼを含む種々のメディエーターが、サイクリンの発現抑制を介して増殖を抑制する可能性がある.

ここで動脈硬化巣形成機転における上述の現象の意味を考えてみたい¹⁰⁾. 粥状硬化巣には酸化 LDL に由来すると思われるリゾホスファチジルコリン (lysoPC) が沈着していることが知られているが、最近 DAG の PKC 刺激効果を lysoPC が増強することが報告された⁹⁾. また高濃度のブドウ糖が内皮細胞の PKC を活性化するとの報告もある. この様な現象が in vivo でも起こるなら、高脂血症・高血糖な

ど動脈硬化症の危険因子によって内皮の PKC が活性化されるかも知れない. そうなると内皮細胞は危険因子によって直接傷害されるのみならず PKC を介して増殖 (再生) も障害され、内膜の修復が遅延して病巣の進展が促される可能性がある.

最後に我々の考えを図 5 に示して本稿の締めくくりとしたい.

[文 献]

- 1) Ross, R. *Nature* 1993; **362**, 801-809.
- 2) Hunter, T., and Pines, J. *Cell* 1993; **66**, 1071-1074.
- 3) Pagano, M. et al. *J. Cell Biol.* 1993; **121**, 101-111.
- 4) Girard, F. et al. *Cell* 1991; **67**, 1169-1179.
- 5) Pagano, M. et al. *EMBO J.* 1992; **11**, 961-971.
- 6) Nevins, J. R. *Science* 1992; **258**, 424-429.
- 7) Akiyama, T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**, 7900-7904.
- 8) Schwarz, J. K. et al. *EMBO J.* 1993; **12**, 1013-1020.
- 9) Nishizuka, Y. *Science* 1992; **258**, 607-614.
- 10) Kosaka, C. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **193**, 991-998.
- 11) Leach, K. L. et al. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**, 21816-21822.
- 12) Sasaguri, T. et al. (1993) *Exp. Cell Res.* in press.
- 13) Margolis B. et al. *Science* 1990; **248**, 607-610.
- 14) Peters, K. G. et al. *Nature* 1992; **358**, 678-681.
- 15) Mohammadi, M. et al. *Nature* 1992; **358**, 681-684.
- 16) Decker, S. J. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**, 9176-9179.
- 17) Valius, M. and Kazlauskas, A. *Cell* 1993; **73**, 321-334.
- 18) Resnitzky, D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**, 402-406.
- 19) Cocks, B. G. et al. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**, 12307-12310.
- 20) Howe, P. H. et al. *Mol. Cell. Biol.* 1991; **11**, 1185-1194.
- 21) Laiho, M. et al. *Cell* 1990; **62**, 175-185.
- 22) Pfeffer, L. M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**, 7988-7992.