フォーラム 15 血管壁細胞の相互反応と血管病変治療法への応用

平滑筋細胞の脱分化制御機構と治療薬開発¹長谷川 一 英²

はじめに

動脈硬化症あるいは冠動脈拡張術 (PTCA) 後再狭窄の主因の一つに、平滑筋細胞の異常増殖がある。これまでに平滑筋細胞の増殖を抑制する薬剤の開発がさかんに行われてきたが、細胞選択性などに問題があり、臨床上有効性が確認されたものはほとんどない。そこで、新たな作用機作で平滑筋細胞の増殖を特異的に抑制する薬剤の開発が望まれている。

動脈硬化巣で観察される平滑筋細胞は、正常な平滑筋細胞と比べて形質が変化している。正常な平滑筋細胞は細胞内の大部分を筋フィラメントが占め、血管の収縮、弛緩を担い、収縮型 (分化型) と呼ばれている¹⁾。一方、動脈硬化巣でみられる平滑筋細胞は、筋フィラメントが著しく減少し、代わって小胞体やミトコンドリアなどの器官が発達し、増殖、遊走能が亢進している。この形質の平滑筋細胞を合成型 (増殖型) と呼んでいる¹⁾。そこで、合成型平滑筋細胞を収縮型に誘導することができれば、平滑筋細胞特異的に異常増殖を抑制できると考えられる。ところが、平滑筋細胞の形質変換機構はほとんど明らかになっていない。その一つの理由に、*in vitro* で形質変換を再現できる系がないことがあげられる。

骨格筋細胞の場合は、多分化能を有する 10T1/2 細胞が骨芽細胞に分化するという *in vitro* 系が存在したため、分化制御因子 MyoD の発見に成功した²⁾。MyoD は骨格筋特異的遺伝子の発現を調節する転写因子としての機能を有し

ていることも明らかになり³⁾、分化機構の解析が飛躍的に進んだ。

以上のことから、本研究では、*in vitro* で平滑筋細胞の形質変換を再現する系を構築して、形質変換機構を解析し、さらに合成型平滑筋細胞を収縮型に誘導する、形質制御薬剤の探索を行うことを目的とした。

平滑筋細胞の形質が変化するとき、細胞内微小構造の変化とともに分子マーカーの発現も変動する。収縮型平滑筋細胞では、平滑筋型ミオシン重鎖 (SM1, SM2), 高分子型カルデスモン, カルポニン, SM22 α といった平滑筋特異的蛋白質の発現が強い⁴⁻⁶⁾。しかし、合成型平滑筋細胞においては、上記マーカー蛋白質の発現は著しく減少もしくは消失し、代わって非筋型ミオシン重鎖 (SMemb), 低分子型カルデスモンの発現が増加している⁴⁻⁶⁾。したがって、これらの分子マーカー (平滑筋細胞形質マーカー) の発現調節機構を解析することで、骨格筋の MyoD と同様の分化制御因子を解明する糸口をつかむことができる。また、合成型平滑筋細胞に種々の化合物を添加し、収縮型形質マーカーの発現を上昇させるものを選択すれば、そのなかには、平滑筋細胞の形質を収縮型に誘導できるものが含まれると期待できる。そこで、形質マーカーの発現を維持し、その発現レベルが変動するような平滑筋の培養系の構築を行った。

I. 株化平滑筋細胞 SVS30 の樹立

一般に血管平滑筋細胞は、生体内より摘出して培養すると、速やかに収縮型の形質が失われ合成型に変化してしまう⁷⁾。培養を続けた平滑筋細胞では収縮型形質マーカーの発現が消失し二度と発現しなくなってしまう。このような細胞では本研究に使用することはできない。そこで、平滑筋形質マーカーの発現を維持したまま培養しつづけることが可能な株化平滑筋細胞の樹立を試みた。

株化平滑筋細胞の樹立には、東北大学加齢医学研究所、帯刀益夫先生のグループで開発された、温度感受性変異 SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いた。SV40 ラージ T 抗原は細胞の増殖を促進する因子であり、このトランスジェニックマウスから取り出した

¹ 1997 年 6 月, 第 29 回日本動脈硬化学会総会 (東京) において発表。

² (株) ベッセルリサーチ・ラボラトリー

Molecular Mechanisms of Smooth Muscle Cell Dedifferentiation and Development of Drugs for Regulation of Smooth Muscle Cell Differentiation.

Kazuhide Hasegawa: Vessel Research Laboratory Co., Ltd, Tokyo, Japan

Key words: Smooth muscle cell, Phenotypic modulation, SV40 large T-antigen transgenic mouse, Luciferase reporter system

原稿受取日: 1998 年 6 月 2 日

細胞は、高い増殖能および不死化能を獲得している。したがって、これまで培養が困難であったような組織の細胞をも培養を続けることができる。さらに、SV40 ラージ T 抗原に温度感受性の変異が入っているため、33°C では高い増殖能を示すが、39°C で培養すると増殖速度が著しく低下するか、もしくは増殖が停止する。また、これまでにこのトランスジェニックマウスから数多くの株化細胞が樹立されているが、その性質から、生体内での分化形質を保持した細胞を樹立できる、非常に優れた方法であることがわかっている⁸⁾。

Fig. 1 Expression of cytoskeletal proteins in SVS30 cells: SVS30 cells were seeded onto a Lab-Tek chamber slide (8-well), cultured at 33°C for 3 days, and stained with anti-SM1 antibody (A), anti-smooth muscle α -actin antibody (B), anti-calponin antibody (C).

上記トランスジェニックマウス (7週令) の大動脈より、Campbell らの方法⁹⁾ にしたがって、平滑筋細胞を単離、培養した。そして、コロニー形成法でクローニングを行った。35コロニーをピックアップし、蛍光抗体法で SM1 の発現を維持したクローンを選択した。最終的に 6 クローンを選択したが、本研究では SVS30 株を用いている¹⁰⁾。

SVS30 株は SM1 のみならず、カルポニン、SM22 α 、 α -アクチン、高分子型カルデスモンといった収縮型形質マーカーの発現を維持している (Fig. 1)。しかし、平滑筋型ミオシン重鎖のもう一つのアイソフォームである SM2 の発現はみられない。また、合成型形質マーカーである非筋型ミオシン重鎖の発現が高く、合成型に近い形質であると考えられる。SVS30 株は 50 回以上継代を重ねても収縮型形質マーカーの発現を維持していた。このように、長期にわたり平滑筋細胞の形質を維持できるという性質は、これまでの培養平滑筋細胞では実現できなかったものであり、有用な細胞と考えられる。

SVS30 株が実際に SV40 ラージ T 抗原を発現しているかどうかを調べたところ、33°C では強い発現が観察され、39°C では発現量が著しく低下していた。また、この発現と対応するように増殖速度も温度に依存し、33°C では倍加時間が 20 時間程度であったが、39°C での増殖は著しく低下し、T 抗原により増殖がプロモートされていることが示唆された (Fig. 2)。

さらに、培養温度を変えたときの収縮型形質マーカー (SM1, カルポニン) の発現を Northern blotting および Western blotting で調べた。両マーカーとも 39°C で培養すると、33°C で培養したときよりも、mRNA、蛋白質レベル

Fig. 2 Temperature-dependent growth of SVS30 cells: SVS30 cells were seeded at 5×10^3 cells/60-mm dish and cultured at 33°C (○) or 39°C (●). At the time indicated, cells were dispersed with trypsin and counted. Values are means $\pm$ range from duplicate experiments.

Fig. 3 Effect of culture temperature on the amount of mRNA of marker genes for the contractile phenotype in SVS30 cells: SVS cells were harvested under 4 culture conditions: subconfluent at 33°C, postconfluent at 33°C, subconfluent at 39°C, and shifted to 39°C after confluence at 33°C (postconfluent at 39°C). A, hybridization with SM1 probe; B, hybridization with calponin probe; C, hybridization with GAPDH probe. lane 1, subconfluent at 33°C; lane 2, postconfluent at 33°C; lane 3, subconfluent at 39°C; lane 4, postconfluent at 39°C; lane 5, BALB/3T3 cells; lane 6, small intestine; lane 7, brain; lane 8, heart; lane 9, skeletal muscle.

いずれも数倍から 10 倍程度上昇していた (Fig. 3)。

以上の結果をまとめると、SVS30 株は 33°C では増殖能が高く形質マーカーの発現が低い。一方、39°C では増殖能が低下し、形質マーカーの発現が上昇するということになる。このことは、SVS30 株が 33°C では合成型、39°C では収縮型に近い形質を示し、部分的ではあるが、*in vitro* で形質変換を再現できるモデルということができる。そこで、SVS30 株を用いて以下の、形質変換機構の解析および薬剤探索系の構築を行った。

II. 収縮型形質マーカー遺伝子発現制御機構の解析

マウス SM22 α 遺伝子 5'-上流域の解析はすでに報告されており、転写開始点より 5'-上流域 1.3 kb のなかに、平滑筋特異的な発現に必要な配列があることがわかっている¹¹⁾。そこで、マウスゲノム DNA より PCR 法によって 1.3 kb をクローニングした。クローニングした 5'-上流域には、CArG box, MEF2, Sp1 などのコンセンサスな配列が存在した。この遺伝子断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んで、レポータープラスミド pSM22-9 luc を造成した。このレポータープラスミドは平滑筋細胞選択的に高いルシフェラーゼ活性を示した。

SM22 α 遺伝子 5'-上流域のプロモーター活性を調べるために、レポータープラスミドの欠失変異体を造成した。これを SVS30 株に導入してレポーター活性を測定したところ、-288 bp まで削っても活性は保持していたが、-255 bp まで削ると活性は著しく低下した (Fig. 4)。-285 bp から -255 bp までの間には CArG box の配列が存在する。

次に、-285 bp から -255 bp までの領域に変異を入れたレポータープラスミドを造成した。そのレポーター活性を測定したところ、CArG box に変異を入れた場合に活性が減少し、この配列が遺伝子発現に重要であることが示唆された。

さらに、SVS30 株の核抽出液を用いて、-285 bp~-255

Fig. 4 Identification of transcriptional regulatory elements that control SM22 α gene expression in SVS30 cells. SM22 α /luciferase reporter plasmids were transiently transfected into triplicate cultures of SVS30 cells. Cells were harvested 24 h after transfection, and cell extracts were assayed for luciferase activities. Data are presented as mean $\pm$ SD.

bp の配列に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、主に 3 本バンドが検出された。これらのバンドは野生型の配列の competitor で消失したが、CArG box に変異を入れた competitor では消失しなかった。また、バンドのパターンは線維芽細胞 BALB/3T3 の核抽出液を用いた場合とは異なっていた。

最近、SM22 α 遺伝子 5'-上流域の CArG box に Serum responsive factor (SRF) が結合すること、SM22 α 遺伝子の発現誘導には SRF 単独では不十分で、他の因子と複合体を形成する必要があることが報告された¹²⁾。このような因子を同定する場合にも、SM22 α 遺伝子の発現を維持したまま長期間培養できる SVS30 株は、大量調製が可能であり、有力なツールとなる。

III. 平滑筋細胞形質制御薬探索系の構築

これまで、薬剤の探索の主なターゲットは酵素および受容体であった。しかし最近は、これらに加え、遺伝子転写をターゲットとした薬剤探索が盛んに行われるようになった。酵素や受容体をターゲットとした薬剤は、基本的にはその酵素あるいは受容体にのみ特異的に作用する。これに対し、遺伝子発現をターゲットとした薬剤は、一つの薬剤で一連の遺伝子群の発現を制御でき、疾患をより強く抑えることが期待できる¹³⁾。今回、われわれが目的としている平滑筋細胞の形質を一挙に変化させる薬剤は、まさに一連の遺伝子群の発現を制御するものである。また、遺伝子転写をターゲットとした薬剤探索では、ルシフェラーゼレポーター系を用いることで、多量のサンプルを簡便で迅速に処理することが可能である。

ルシフェラーゼレポーター系を薬剤探索に応用するためには、レポータープラスミドを安定に保持する細胞株を構築する必要がある。そこで、SM22 α 遺伝子レポータープラスミド、pSM22-9 luc に Neomycin 耐性遺伝子を組み込んだ pSM22-9 luc neo を造成して、SVS30 株に導入、G418 耐性株を 14 クローン取得した。これらの中からルシフェラーゼ活性の高いクローンとして 7 クローンを選択した。

次に、SM22 α 遺伝子の発現パターンとルシフェラーゼ活性のパターンが相関しているクローンを選択するために、SM22 α 遺伝子の発現変動パターンを解析した。無血清培養した SVS30 株を種々の増殖因子で刺激して SM22 α 遺伝子の発現が変動するかどうか調べたところ、PDGF、FGF、TGF- β などでは発現はほとんど変化しないのに対し、10% ウシ胎児血清あるいはトロンビンで刺激すると 5～10 倍、発現が上昇することを見出した。先に選択した 7 クローンのルシフェラーゼ活性が、同様に変動するかどうかを調べたところ、いずれのクローンにおいても 10% ウシ胎児血清あるいはトロンビン刺激により活性が上昇し、

ルシフェラーゼ活性が SM22 α の遺伝子発現をモニターしていることが示された。7 クローンの中で最も反応性のよかつたクローン 6 を以降の薬剤探索に用いることにした。

さらに、ジーントラップ法を用いてカルボニンレポーター細胞を作製した。ジーントラップ法とは、目的の細胞にプロモーターを欠いたレポーター遺伝子を導入し、染色体上で活性化されているプロモーターの下流に挿入されたときのみレポーター活性が検出できるというものである。相同組換えと同様に本来の遺伝子座にレポーター遺伝子が組み込まれるため、転写調節が完全なレポーター系を作ることができる。

ジーントラップベクターは、(1) レポーター遺伝子、(2) 選択マーカー遺伝子、(3) レスキューマーカー遺伝子の 3 部分から構成される。今回造成したベクター plucGT では、(1) としてルシフェラーゼ遺伝子、(2) として Neomycin 耐性遺伝子、(3) としてアンピシリン耐性遺伝子+コリシン E1 複製開始起点を使用した。トラップ効率を上げるため、ルシフェラーゼ遺伝子上流にスプライシングアクセプター配列を接続して、イントロン内に挿入された場合でもレポーター遺伝子が発現するようにした。また、Neomycin 耐性遺伝子のポリ A 付加シグナル配列を除去し、ジーントラップがおきたときのみ G418 耐性となるようにした。

plucGT を SVS30 株に導入して G418 耐性クローンを 156 株得た。これらのうちの 31 株にルシフェラーゼ活性が検出された。トラップされた遺伝子の配列を調べた結果、1 つのクローンがマウスカルボニン遺伝子 5'-上流域の配列と一致していた。

このクローンのルシフェラーゼ活性が、SVS30 株におけるカルボニンの遺伝子発現をモニターしているかどうかを検討した。カルボニンの遺伝子発現も SM22 α と同様に血清およびトロンビン刺激で上昇するが、得られたクローンのルシフェラーゼ活性も同じ変動パターンを示した。以上の結果より、このクローンをカルボニンレポーター細胞 SVS-CN とした。

これらのレポーター細胞を用いて既存の薬剤の評価を行った。カルシウム拮抗薬、ACE 阻害剤、アンジオテンシン II 拮抗薬、抗がん剤などヒトの PTCA 後再狭窄には効果のなかった薬剤にはレポーター活性上昇作用はなかった。しかし、PTCA 後再狭窄に有効であることが報告されている Tranilast¹⁵⁾ に、弱いながらレポーター活性上昇作用が見られた (Fig. 5)。この結果から、今回構築した薬剤探索系は、無効であった既存薬と同様の作用をもつ化合物を排除することができ、新たな作用機作の化合物を見出すことができるものと期待している。

Fig. 5 Effects of drugs on the reporter activity in SM22 α reporter cells. Nifedipine (○), Enalapril (△), Captopril (□), Tranilast (●), or DuP753 (▲) were added into triplicate cultures of SM22 α reporter cells. After 6 h incubation, cell extracts were assayed for luciferase activities.

ま と め

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスの大動脈から株化平滑筋細胞 SVS30 を樹立した。SVS30 株は *in vitro* で合成型と収縮型の形質変換を再現できる細胞であることを示した。SVS30 株を用いて収縮型マーカー遺伝子の発現調節機構を解析した。さらに、合成型の細胞を収縮型に誘導する平滑筋形質制御薬の探索系を構築した。

この探索系については、今後、製薬企業に広く公開し、抗動脈硬化薬の開発に利用していただきたいと考えている。

謝辞：発表の機会を与えていただきました、高野達哉先生、児玉達彦先生に感謝いたします。

文 献

- Schwartz SM, Campbell GR, and Campbell JH: Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*, 58: 427-444, 1986
- Davis RL, Weintraub H, and Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51: 987-1000, 1987
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra TK, Turner D, Rupp R, and Hollenberg S: The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 230: 758-766, 1991
- Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Katoh H, Tsai RC, Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohkubo A, and Takaku F: cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis. *J Biol Chem*, 266: 3768-3773, 1991
- Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, and Weissberg PI: High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 93: 2392-2402, 1994
- Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, Orekhov AN, Koteliensky VE, and Smirnov VN: Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: A study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9542-9546, 1988
- Shanahan CM, Weissberg PL, and Metcalfe JC: Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 73: 193-204, 1993
- Obinata M: Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-antigen transgenic mice. *Genes to Cells*, 2: 235-244, 1997
- Campbell JH, Kocher O, Skalli O, Gabbiani G, and Campbell GR: Cytodifferentiation and expression of alpha-smooth muscle actin mRNA and protein during primary culture of aortic smooth muscle cells. Correlation with cell density and proliferative state. *Arteriosclerosis*, 9: 633-643, 1989
- Hasegawa K, Arakawa E, Oda S, Yanai N, Obinata M, and Matsuda Y: Novel smooth muscle cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. Temperature-dependent expression of smooth muscle myosin heavy chain-1 and calponin genes. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 2177-2186, 1997
- Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger JE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, and Parmacek MS: Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 α . *J Biol Chem*, 270: 13460-13469, 1995
- Li L, Liu ZC, Mercer B, Overbeek P, and Olson EN: Evidence for serum response factor-mediated regulatory networks governing SM22 α transcription in smooth, skeletal, and cardiac muscle cells. *Dev Biol*, 187: 311-321, 1997
- 中田 進: 核内情報伝達と創薬。遺伝子の転写をターゲットとした創薬のための性細胞スクリーニング系。ファルマシア, 32: 30-33, 1996
- 加藤和三, 玉井秀男, 早川弘一, 山口 徹, 上松瀬勝男, 土師一夫, 相澤忠範, 鈴木 紳, 高瀬真一, 鈴木孝彦, 西川英郎, 中西成元, 加藤 修, 中島光好: 経皮的冠動脈形成術後の再狭窄に対するトラニラストの臨床的検討。プラセボを対照とした第 III 相二重盲検比較試験。臨床医薬, 12: 65-85, 1996