酸素化によるラット動脈管平滑筋細胞からのエラスチン分泌の減少

川上 翔士¹⁾, 南沢 享^{1,2)}早稲田大学先進理工学部生命医科学科¹⁾,東京慈恵会医科大学細胞生理学講座²⁾

Key words :

ductus arteriosus, hypoxia, oxygen, elastin, liquid chromatography - tandem mass spectrometry

Oxygenation Decreases Elastin Secretion from Smooth Muscle Cells of the Rat Ductus Arteriosus

Shoji Kawakami¹⁾, Susumu Minamisawa^{1, 2)}¹⁾Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, Tokyo, Japan²⁾Department of Cell Physiology, The Jikei University, Tokyo, Japan

Background: The ductus arteriosus (DA), a fetal arterial connection between the main pulmonary artery and the descending aorta, normally closes immediately after birth. The oxygen concentration in the blood rises after birth; in the DA, this increase causes functional closure, which is induced by smooth muscle contraction. Previous studies have demonstrated that hypoxia and/or oxygenation affect vascular remodeling. Therefore, we hypothesized that the rise in oxygen concentration would affect the vascular structure of the DA by producing proteins secreted from DA smooth muscle cells (SMCs).

Method and Results: We performed LC-MS/MS analyses to comprehensively investigate the secreted proteins in the supernatants of rat DA SMCs that were harvested under a hypoxic condition (1% oxygen) or under a normoxic condition (21% oxygen). We found that the rise in oxygen concentration reduced the secretion of elastin from DA SMCs. Reverse transcription-polymerase chain reaction analyses also revealed that the expression levels of elastin mRNA were down-regulated in DA SMCs from a hypoxic to a normoxic condition.

Conclusion: Our in vitro study demonstrated that the rise in oxygen concentration reduced the secretion of elastin. Because elastin forms internal elastic lamina and elastic fibers in the vascular muscle layers, this study suggests that the rise in blood oxygen concentration after birth reduces the secretion of elastin, which may play a role in DA structural remodeling after birth.

要 旨

背景: 主肺動脈と下行大動脈を短絡する血管として知られる動脈管は、通常出生後直ちに閉鎖する。血中酸素濃度は出生後に増加する。動脈管ではこの酸素濃度上昇が動脈管平滑筋の収縮を引き起こし、動脈管の機能的閉鎖を生じる。一方、これまでの先行研究では低酸素や酸素投与が血管のリモデリングに影響することが報告されている。そこでわれわれは酸素濃度の上昇が動脈管平滑筋から分泌されるタンパク質を介して血管構造に影響を及ぼしていると仮説を立てた。

方法と結果: われわれは LC-MS/MS 解析を行い、低酸素下(酸素 1%)および正常酸素下(酸素 21%)のそれぞれで培養した、ラット動脈管平滑筋細胞の上清中の分泌タンパク質を網羅的に調べた。その結果、酸素濃度の上昇により動脈管平滑筋細胞から分泌されるエラスチンが減少することを見い出した。RT-PCR 解析においても低酸素下から正常酸素下になることで動脈管平滑筋細胞においてエラスチン mRNA の発現が減少することを確認した。

結論: *in vitro* での本研究から酸素濃度の上昇によりエラスチンの分泌が減少することを見い出した。エラスチンは内弾性板を形成し血管平滑筋層のエラスチン線維を形成することから、今回の研究は出生後の血中酸素濃度の上昇がエラスチンの分泌を減少させ、出生後の動脈管構造のリモデリングにも影響している可能性を示唆するものである。

2012 年 12 月 12 日受付 別冊請求先: 〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8

2013 年 8 月 14 日受理 東京慈恵会医科大学細胞生理学講座 南沢 享

はじめに

動脈管は肺動脈と下行大動脈をバイパスする胎生期特有の血管であり、通常は出生後速やかに閉鎖する。動脈管の閉鎖には機能的閉鎖と解剖学的閉鎖の二種類の機序が働き、恒久的な閉塞に至る。機能的閉鎖は出生後のプロスタグランジン E₂ の減少と自発呼吸による血中酸素濃度の上昇による血管収縮により引き起こされ、特に酸素濃度の上昇はカリウムチャネルの働きを阻害し、膜電位を上昇させる。これが電位依存性カルシウムチャネルの開口を促すことで、細胞内カルシウム濃度が上昇し、平滑筋の収縮に関与していることが報告されている¹⁾。解剖学的閉鎖は動脈管平滑筋細胞の血管内皮下への侵入や細胞外基質の蓄積などによる血管内膜の肥厚が特徴的であり、その後アポトーシスの進行から血管の線維化を引き起こす²⁾。この解剖学的閉鎖には内腔が閉塞した後の低酸素状態が血管アポトーシスの進行を促す因子であるという報告がある³⁾。しかし胎生期の低酸素状態から、出生後の呼吸開始に伴って血中酸素濃度が上昇する過程で、酸素濃度の変化が動脈管リモデリングにいかに関与しているか、という研究はわれわれの知る限り報告されていない。一方で、血中酸素濃度に着目した遺伝子発現変化に関する研究は行われており、ヒト肺動脈においては、通常酸素濃度下と低酸素下において培養した平滑筋細胞の遺伝子発現の違いについて DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に調べたものなどがある⁴⁾。

今回われわれは酸素濃度上昇によって動脈管から分泌されるタンパク質が血管リモデリングに影響を及ぼすという仮説のもと、低酸素下で培養したラット動脈管平滑筋細胞を通常酸素下に移し培養することで、継続して低酸素下で培養したものと比較し、その細胞から上清中に分泌されたタンパク質の変化を液体クロマトグラフィー質量分析法(Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)というタンパク質を網羅的に解析する装置で測定した。

方 法

1. 動脈管平滑筋細胞の初代・継代培養

胎生満期のウィスターラットを日本 SLC(静岡市)より購入し、胎生 21 日の胎仔を帝王切開で取り出した後、その動脈管を摘出した。摘出した動脈管を Collagenase/dispace (Roche), Elastase Type II-A (SIGMA), Trypsin inhibitor type II-S (SIGMA), ウシ血清アルブミン (BSA) V (SIGMA) を混ぜた溶液中で 37℃, 15 分保温し, 1,000rpm

で 1 分遠心した後に上清を取り除いた。そこへ Collagenase II (Worthington biochem), Trypsin inhibitor type I-S (SIGMA), BSA V (SIGMA), HBSS (SIGMA) を混ぜた溶液を加え、再度 37℃ 12 分保温した後、10%FBS 入り DMEM を加え 1,000rpm で 3 分遠心、上清を取り除き、再度 10%FBS 入り DMEM を加え、よく攪拌して 3.5cm 培養プレートに播種した。培養プレートは予め, Poly-L-lysine Hydrobromide (Wako) でコーティングしたものを使用した。その後、動脈管平滑筋細胞を継代培養し、4 継代目において一部のプレートにプロスタグランジン E₂ 受容体のひとつ、EP4 に対する刺激薬(ONO-AE1-329, 10-6M)を投与し、培養上清中のヒアルロン酸濃度を測定した。われわれの先行研究では、継代された培養細胞が動脈管平滑筋細胞の性質を保有している場合には、EP4 刺激薬によって、上清中のヒアルロン酸濃度が 50ng/mL 以上の上昇がみられることが確認されている。本研究ではその条件に適した動脈管平滑筋細胞のうち、6 継代目までの細胞を利用した。

2. 低酸素刺激

6 継代目までの動脈管細胞を 2 枚の培養プレートに播種後、細胞の定着を促すため 2 日間通常酸素下の細胞培養器(O₂: 21%, CO₂: 5%, N₂: 74%, pO₂: 163mmHg)で培養し、その後 3 日間低酸素細胞培養器(O₂: 1%, CO₂: 5%, N₂: 94%, pO₂: 26.8mmHg)で培養した。その後、本研究では上清中に出てくる分泌タンパク質を測定するために、低酸素下においてあった血清を含まない DMEM で上清を替えた。一方を通常の 21%O₂ 下の細胞培養器に戻し、もう一方は継続して低酸素細胞培養器で培養を続けた。それぞれ細胞上清を 24 時間で回収した。また、経時的な mRNA 発現量の変化を調べるため、前記とは別に、同様の操作を行い、通常酸素下の細胞培養器に移した細胞について細胞懸濁液を 0 分, 1 時間, 24 時間で回収した(Fig. 1)。

計 測

1. 定量的リアルタイム PCR 解析

TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて total RNA を抽出後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI)を用いて cDNA を調製した。調製した cDNA を Fast SYBR Green Master Mix (ABI)を用いて推奨されたプロトコルで qRT-PCR した。内因性対照群にはミトコンドリア RNA の一つである 18S を用いた。PCR プライマーは Table 1 にまとめたものを用いている。

Fig. 1 Experimental design. We collected the culture media of DA smooth muscle cells under a normoxic or a hypoxic condition. For quantitative RT-PCR analyses, we also collected the whole cell lysates at 0 min, 1 hour, and 24hours after changing from a hypoxic to a normoxic condition.

Table 1 The primer sequences for quantitative RT-PCR analyses.

Gene	NCBI ref_seq accession no.	Primer sequences	
		Forward	Reverse
VEGF	NM_001110333	CCGGACGGGCTCTGAAACC	GGTGCAGCCTGGGACCACTTG
Tropoerastin	NM_012722	GCTATGGACTGCCCTATACCAA	CGCCTGTAATGCCTCCAA
Biglycan	NM_017087.1	GGTTGGCCCTGACGGACAGAC	CGCATGGTCAATGTTCTGGGGA
Fibronectin	NM_019143.2	TGACCCCATCGACCAGTGCCA	CCCCAATGCCACGGCCGTAA
18S	NR_003286.2	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

2. LC-MS/MS 解析

通常酸素下と低酸素下での分泌タンパク質の比較を行うため、回収した細胞上清を Centrifugal Filter Units (MILLIPORE)を用いて平均 $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ まで濃縮した。タンパク質濃度は標準用タンパク質として BSA を使い、Quick Start Bradford プロテインアッセイキット (Bio-Rad)を用いて 595nm での吸光度を測定し計測した。濃縮細胞上清から標本あたりタンパク量 $0.2 \mu\text{g}$ を使い解析を進めた。それぞれの細胞上清を遮光したうえで、reduction buffer [8M, Urea; 500mM, Tris-HCl; 2.5mM, EDTA] $15 \mu\text{L}$ と DTT を加え、 37°C で 90 分保温した。その後、250mM iodoacetamide を $5 \mu\text{L}$ 加え、再度 37°C で 30 分保温し、50nM, Ammonium hydrogen carbonate を $180 \mu\text{L}$, trypsin ($200\text{ng}/\mu\text{L}$) を $1 \mu\text{L}$, 100mM calcium chloride を $0.08 \mu\text{L}$ 加え、 37°C で 16 時間保温した。最後に 3 回 ZIP-TIP 処理を行い精製し、LC-MS/MS (NanoFrontier eLD, HITACHI)を用いて質量分析を行った。Mascot Server (マトリックスサイエンス株式会社)の解析システムを用いて、質量分析計から得られた質量データに一致するアミノ酸配列をタンパク質やゲノムの配列データベースから検索し、試料に含まれる

タンパク質を同定した。本実験の精度管理は、既報のガイドラインに準拠して行った⁵⁾。

3. Western blot 解析

回収した細胞上清を平均 $0.22 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ まで濃縮後、先行研究⁶⁾と同様の操作で Western blot 解析を行った。実験では標本あたりタンパク質 $3.4 \mu\text{g}$ 量を SDS-PAGE ゲルで泳動した。1 次抗体は Anti-Elastin (Elastin Products Company, RA75) を使用し、2 次抗体は Anti-Goat HRP (SC-2020 J169) を使用した。目的タンパク質の定量化は LAS-3000 imaging system (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を使用して解析した。なお、今回の Western blotting では培養上清を用いたため、比較対照となる適当なタンパク質がないため、本実験においてはタンパク質量が一定であると仮定し、対照で補正することなく、得られた値をそのままグラフ化した。

結 果

1. 低酸素刺激の確認

低酸素による刺激が細胞に影響を与えているのかを

Fig. 2 The expression levels of VEGF mRNA in DA smooth muscle cells. The change from a hypoxic to a normoxic condition reduced its expression level.
N = 6, * : $p < 0.05$ (compared with 0min.)

Table 2 LC-MS/MS analysis on culture media of DA smooth muscle cells. The numbers indicate the ratio of secreted proteins in a normoxic to a hypoxic condition.

Protein name	Sample1	Sample2	Sample3	Average
Elastin	0.7	0.64	0.88	0.74
Fibronectin	0.95	0.74	0.94	0.88
Biglycan	0.97	0.64	1.06	0.89
Extracellular superoxide dismutase	0.91	0.85	1	0.92
Protein NOV homolog	1.05	0.62	1.1	0.92
Collagen alpha-2	1.14	0.74	1.42	1.01
Matrix Gla protein	1.38	0.92	1.13	1.14

確認するため、低酸素から通常の細胞培養器に移した平滑筋細胞サンプルについて0分、1時間、24時間でVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の発現量をqRT-PCRを用いて測定した。低酸素下で発現が増加することが知られているVEGFが通常酸素下に戻されることで減少することが確認できた(Fig. 2)。

2. LC-MS-MS

通常酸素下と低酸素下でそれぞれ24時間培養した細胞上清についてLC-MS/MSでその分泌タンパクを網羅的に解析し、その結果をNormoxia/Hypoxiaで示してある(Table 2)。Normoxia/Hypoxiaの値が1より低いと、通常酸素下でそのタンパク質の分泌が低酸素下で継続して培養したものよりも低下したといえる。サンプル1～3についてはそれぞれ別の親由来の胎仔動脈管を採取し、継代培養した動脈管平滑筋培養細胞を使って実験している。この結果から、エラスチン、フィブロネクチン、バイグリアンの分泌が通常酸素下の培養条件

で減少することがわかった。これらは細胞外マトリックスの主要構成因子であり、中でもエラスチンは血管において弾性線維を形成し、血管に弾力性を与える働きをしていることが知られている。

3. Western blot

LC-MS/MSの結果を踏まえ、細胞上清中に含まれるトロポエラスチンについてWestern blot法を用いてさらに詳細に解析した(Fig. 3)。トロポエラスチンはエラスチンの前駆体である。この結果から、通常酸素下に置かれることで上清中に含まれるトロポエラスチンの量が半分程度まで減少することがわかった。

4. qRT-PCR

低酸素から通常の細胞培養器に移した動脈管平滑筋培養細胞について0分、1時間、24時間におけるトロポエラスチン、フィブロネクチン、バイグリアンの細胞懸濁液中のmRNA発現量を測定した(Fig. 4)。トロ

Fig. 3 The expression levels of elastin protein in culture media.

a : Sample numbers of 1 and 6, 2 and 7, 3 and 8, 4 and 9, and 5 and 10 are the same origin of DA smooth muscle cells.

b : The expression levels of elastin protein were decreased in a normoxic condition.

N = 5, ** : $p < 0.01$

ポエラスチンとバイグリカンの mRNA は 1 時間での減少はみられたが, 24 時間後では変化がなかった. またフィブロネクチンについては 24 時間継続した減少が確認できた.

結 論

低酸素刺激が適切に行われているかを確認する目的で, 低酸素下から通常酸素下へ移した細胞懸濁液の VEGF mRNA を qRT-PCR で測定した実験では 24 時間継続した mRNA の減少が確認できた. なお, 本研究においては, 低酸素状態のまま平滑筋細胞を培養し続け, 酸素化した細胞と同様の時間経過(1 時間, 24 時間後)の状態での平滑筋細胞からは mRNA を回収していないため, 厳密な意味では低酸素状態に比べて低下したと断定できないかもしれない. しかしながら, 本研究では細胞を播種してから 5 ~ 6 日目の 80 ~ 90% 融合状態の細胞を使用しているため, VEGF をはじめとする各遺伝子群の発現量は一定レベルに収束しており, 24

時間内では大きな変化がないことが推定される. VEGF は Hypoxia Inducible Factor (HIF) により活性化されることが知られており, HIF は低酸素下では通常酸素下に比べそのタンパク質レベルでの発現が上昇する^{7,8)}. したがって, われわれは VEGF mRNA の低下を認めた結果から低酸素刺激は適切に行われていると判断した.

次に LC-MS/MS の結果では, 通常酸素下でのエラスチン, フィブロネクチン, バイグリカンの減少が確認できた. 中でもエラスチンは血管の弾性に大きく影響していることが知られている. また動脈管とエラスチンについて, 別のグループの先行研究では大動脈平滑筋に比べ, 動脈管平滑筋ではエラスチンの減少により細胞遊走がより促進される可能性も示唆されている⁹⁾. エラスチンはトロポエラスチンや Fibrillin などの分子間相互作用により形成されることが知られているが¹⁰⁾, この中でトロポエラスチンについて Western blot を用いて低酸素下と通常酸素下の細胞上清についてその含有量を比較したところ, 通常酸素下に戻した細胞の上清で細胞からのトロポエラスチンの分泌が半分程度ま

Fig. 4 The expression levels of tropoelastin, biglycan, and fibronectin mRNAs.
N = 3, * : p < 0.05 (compared with 0 min)

で減少していることがわかった (Fig. 3). これらの結果から、トロポエラスチンの上清中での減少が、エラスチンの減少の一因になっていると考えられる。そこでわれわれは qRT-PCR を用いて、LC-MS/MS と Western blot で減少が確認できたトロポエラスチン、フィブロネクチン、バイグリカンについてその細胞レベルでの mRNA 量の経時変化を検討した。トロポエラスチンとバイグリカンは 1 時間での減少がみられたが、24 時間後では低酸素下に置かれていた時 (Fig. 4 a, b 0min) と同様の発現量であった (Fig. 4). この結果から、細胞上清中のトロポエラスチンの分泌減少に関連した mRNA レベルでの変化は確認できなかった。今後はトロポエラスチンの分解促進の可能性も考えて実験を進めていきたい。

動脈管は出生後の血中酸素分圧変化にダイナミックに反応する血管であり、血中酸素分圧による変化が、これまでに知られていたチャネル活性に関連した平滑筋収縮による機能的閉鎖だけに留まらない可能性も考えられる。われわれの知る限り、酸素化が動脈管平滑筋細胞でのエラスチン分泌を低下させる、という報告

は本研究が初めてである。他の細胞や組織を使った実験において酸素化や低酸素によるエラスチン発現変化をみた論文はあるが、必ずしも一定の傾向がみられてはいない¹¹⁻¹³). DNA マイクロアレイ解析を用いたわれわれの先行研究¹⁴)や Costa らの研究¹⁵)では、出生前後でエラスチン mRNA の変化は明らかではない。これらの実験では生体から摘出した組織そのものを使っているために、単純に酸素化だけの影響をみているわけではなく、血行動態の変化など出生前後でのさまざまな要因がエラスチン mRNA 発現に関与することを考慮しなくてはならない。実際に、動脈管の研究ではないが、エラスチン発現量は出生後に急激に増加することが知られており、その大きな要因となるのが血圧などの機械的ストレスの増加であると考えられている¹⁶).

一方、機械的刺激がない状態での本研究結果は、動脈管の解剖学的閉鎖、という観点からみると臨床的にも興味深い。動脈管はもともと大動脈などに比して弾性線維の発達が不良であり、このことは出生後に容易に閉塞しやすい点で合目的である^{2, 17}). 先に述べたよう

に出生後の機械的刺激によって、動脈管でもエラスチンは増加する可能性があるが、酸素化によってそれが相殺され、全体として弾性線維の低形成を維持し、閉塞へと導きやすくしている可能性も示唆される。また、新生児領域においては、酸素化や低酸素状態での弾性線維の形成変化は、動脈管のみならず、肺形成においても重要な課題であると考えられる。今回の培養細胞での通常酸素下でのエラスチン減少の結果を踏まえ、実際の生体内での影響についてさらなる研究が求められる。

謝 辞

当研究を行うにあたり実験指導およびデータ解析にご協力いただいた早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻の岩井謙治先生ならびに、LC-MS/MSのデータ解析について貴重なアドバイスをいただいた早稲田大学大学院先進理工学研究科生命理工学専攻の加藤尚志教授に深謝致します。

【参考文献】

- 1) Waleh N, Reese J, Kajino H, et al: Oxygen-induced tension in the sheep ductus arteriosus: effects of gestation on potassium and calcium channel regulation. *Pediatr Res* 2009; **65**: 285-290
- 2) Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y: Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res* 2010; **46**: 77-87
- 3) Clyman RI, Chan CY, Mauray F, et al: Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation. *Pediatr Res* 1999; **45**: 19-29
- 4) Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al: Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; **105**: 659-669
- 5) Kocher T, Pichler P, Swart R, et al: Quality control in LC-MS/MS. *Proteomics* 2011; **11**: 1026-1030
- 6) Jiao Q, Bai Y, Akaike T, et al: Sarcocalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **297**: H576-H582
- 7) Gao N, Ding M, Zheng JZ, et al: Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31963-31971
- 8) Ke Q, Costa M: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; **70**: 1469-1480
- 9) Wachi H: Role of Elastic Fibers on Cardiovascular Disease. *J Health Sci* 2011; **57**: 449-457
- 10) Rabinovitch M: Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol* 1996; **20**: 531-541
- 11) Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, et al: Neonatal mice genetically modified to express the elastase inhibitor elafin are protected against the adverse effects of mechanical ventilation on lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; **303**: L215-L227
- 12) Ambalavanan N, Nicola T, Li P, et al: Role of matrix metalloproteinase-2 in newborn mouse lungs under hypoxic conditions. *Pediatr Res* 2008; **63**: 26-32
- 13) Berk JL, Hatch CA, Morris SM, et al: Hypoxia suppresses elastin repair by rat lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; **289**: L931-L936
- 14) Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, et al: DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci* 2011; **61**: 167-179
- 15) Costa M, Barogi S, Socci ND, et al: Gene expression in ductus arteriosus and aorta: comparison of birth and oxygen effects. *Physiol Genomics* 2006; **25**: 250-262
- 16) Wagenseil JE, Mecham RP: Elastin in large artery stiffness and hypertension. *J Cardiovasc Transl Res* 2012; **5**: 264-273
- 17) Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, et al: Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 2013, [Epub ahead of print]