

血管障害後の内膜肥厚における
血小板由来増殖因子 B 鎖の役割と
その発現調節の解析

出口順夫

血管障害後の内膜肥厚における PDGF-B 鎖の役割とその発現調節の解析

氏名 出口 順夫

略語

PDGF : 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor)

PDGFR : ヒト PDGF- β 受容体 細胞外領域

Ang II : アンギオテンシン II (angiotensin II)

AT1R、AT2R : アンギオテンシン II-1 型受容体、アンギオテンシン II-2 型受容体

TGF : 腫瘍壊死因子 (transforming growth factor)

EGF : 上皮増殖因子 (epidermal growth factor)

FGF : 繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor)

IGF-I : インシュリン様増殖因子-I (insulin-like growth factor-I)

SMC : 血管平滑筋細胞

AdenoLacZ : Eschericia coli LacZ をコードする遺伝子を含むアデノウイルス

AdenoXR : PDGFR をコードする遺伝子を含むアデノウイルス

AdenoCA : 外来遺伝子を含まないアデノウイルス

RT-PCR : 逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

ACE : アンギオテンシン II 変換酵素 (angiotensin converting enzyme)

DN : 優性抑制型

GAPDH : glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase

GST : glutathione S-transferase

ERK : extracellular signal-regulated kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MBP : ミエリン塩基性タンパク

要旨

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor、PDGF) は、バルーン血管拡張術や動脈血行再建術後に発生する内膜肥厚の形成において重要な働きをしていると考えられている。本研究の前半では、アデノウイルスベクターを用いて、PDGF-B鎖と結合しその作用を抑制するPDGF- β 受容体細胞外領域 (PDGFR) を血管壁に遺伝子導入し、内膜肥厚におけるPDGF-B鎖の役割を直接的に検討した。まず、CHO細胞やSf9細胞で組換えPDGFRタンパクを産生させると、PDGFRはPDGF-B鎖と特異的に結合し、その活性を阻害することを確認した。次に、AdenoLacZ (大腸菌 β -galactosidase (LacZ) をコードする遺伝子を含むアデノウイルス) をラット頸動脈バルーン障害モデルに投与し遺伝子導入効率を検討すると、障害直後よりも障害後5日目に投与の方が飛躍的に導入効率が上昇することが明らかとなった。そして、PDGFRをコードする遺伝子を含むアデノウイルス (AdenoXR) を作成し、障害後5日目に障害血管に遺伝子を導入すると、AdenoXR感染群ではアデノウイルス非感染 (内皮剥離障害 (+)) 群に比べ障害後14日目の内膜面積が強く抑制され、内膜・中膜面積比 (I/M 比) で55%の有意な抑制が認められた。一方、AdenoLacZ感染群やAdenoCA (外来遺伝子を含まないアデノウイルス) 感染群では、アデノウイルス非感染 (内皮剥離障害 (+)) 群に比べ、内膜面積に抑制はみられず、I/M 比でも抑制は認められなかった。さらに、障害血管におけるPDGFR発現により、内膜肥厚の抑制とともに、bromodeoxy-uridine (BrdU) を取り込む細胞の減少と、PDGF- α , β 両受容体のリン酸化の抑制がみられた。しかし、EGF受容体のリン酸化は抑制されなかった。

本研究の後半では、障害血管におけるPDGF-B鎖の発現調節について検討した。既に報告されているように、成体ラットの大動脈より樹立した培養血管平滑筋細胞ではアンギオテンシンII(Ang II)刺激によりPDGF-B鎖mRNA発現誘導はおこらなかった。しかし、培養内膜平滑筋細胞(neointimal cell)および、幼若なラットの大動脈から樹立した血管平滑筋細胞(newborn rat SMC)では、Ang II刺激によってPDGF-B鎖mRNA発現が誘導された。その発現はAT1R阻害剤で抑制されたが、AT2R阻害剤によっては抑制されなかった。さらにAng IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現の情報伝達系について検討した。Ang IIにより、3つのMAPK(ERK, JNK, p38)はすべて活性化されたが、MEK阻害剤PD98059でERKの活性化を抑制すると、Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現は完全に抑制された。一方、SB203580でp38の活性化を抑制してもこの発現は抑制されなかった。PDGF-B鎖プロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに組み込んだ遺伝子(Sis-Luc)をトランスフェクトすると、Ang II刺激によりルシフェラーゼ活性は上昇し、Ang IIはPDGF-B鎖遺伝子の転写活性を上昇させることがわかった。さらに、Sis-Lucとともに各MAPKの優性抑制型発現ベクターを遺伝子導入すると、Ang IIによるルシフェラーゼ活性の増加は優性抑制型ERKと優性抑制型JNKの発現により抑制され、優性抑制型p38の発現では抑制されなかった。また、アデノウイルスを用いて優性抑制型Ras変異体を発現させると、Ang IIによるERKの活性化とPDGF-B鎖遺伝子発現誘導は抑制された。一方、サイクリックヌクレオチド誘導体により、Ang IIによるERKおよびJNKの活性化は抑制され、これとともにPDGF-B鎖mRNAの発現も抑制された。

本研究により、内因性PDGF-B鎖が内膜形成において重要な働きをしていることが明らかとなった。さらに、PDGF-B鎖は、形質の変化した内膜平滑筋細胞で産生され、アンギオテンシンIIによる調節を受けていることが示唆された。

序論

動脈血行再建術やバルーン血管拡張術は、閉塞性動脈硬化病変に対する治療として既に確立されている(1)。しかし、術後に発生する内膜肥厚は、高い確率で再狭窄やグラフト不全の原因となり、その病態解明と治療法の確立は急務である。

内膜肥厚の形成過程は主として3つのプロセスよりなると考えられている(2)。すなわち、血管壁に加えられた障害による中膜平滑筋の活性化、活性化された中膜平滑筋細胞の内膜への遊走、そして内膜での平滑筋の増殖である。これらの過程には、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)をはじめとする様々な増殖因子が関与していると考えられる(2-5)。しかし、それらの増殖因子が、内膜肥厚のどの形成過程においてどの程度の関与しているかについては殆ど明らかにされていない。

PDGFにはA鎖とB鎖があり、ホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成している(6)。A鎖はPDGF- α 受容体のみとB鎖はPDGF- α , β 両受容体と結合し、受容体のチロシン残基の自己リン酸化を引き起こす結果、受容体を活性化する。特にPDGF-B鎖は血管平滑筋細胞に対し、強い増殖・遊走活性を有していることから、内膜肥厚の形成においてより重要な役割を果たしていることが示唆されてきた(7)。PDGFの内膜肥厚における関与については、ラット頸動脈バルーン障害モデルを用いてPDGF-BBを持続注入すると内膜肥厚が増強されること(4)、また、PDGF中和抗体を障害後7日間投与すると8日目の時点で内膜肥厚が40%抑制されること(10)、などが既に報告されている。これらのことより、血小板など血管壁外由来のPDGFが、障害の比較的早期の段階で内膜肥厚の形成に関与していると考えられてきた。一方、PDGF- β 受容体が肥厚内膜全体に、またPDGF-B鎖が肥厚内膜

最内層に発現していること(8,9)が最近になって報告され、血管壁由来のPDGFも内膜形成に関与しているのではないかと考えられるようになった。私たちも、障害血管における受容体チロシンリン酸化レベルを測定することにより受容体の活性化を評価したところ、ラット頸動脈障害モデルでは、内膜肥厚が急速に進展する時期(障害後5日~14日)に一致してPDGF- α , β 両受容体が活性化されていることを見出している(11)。しかも、この時期のPDGF受容体の活性化は、血小板の影響の強い障害後1日~3日より強いものであった。しかし、PDGFが、この時期にどの程度、内膜肥厚の形成に関与しているかは全く明らかになっていなかった。

一方、アンギオテンシンII (Ang II) 変換酵素阻害剤やAng II-I型受容体(AT1R)拮抗薬の投与は、バルーン障害後の内膜肥厚の形成を強く抑制する(12-13)。この結果は、Ang IIが内膜肥厚の形成に関与していることを示している。しかし、Ang IIはそれ自体強い細胞増殖・遊走活性を持たないため、Ang IIがどのような機序により内膜肥厚の形成に関与しているのかは明らかになっていなかった。いくつかの*in vitro*の研究により、Ang IIはTGF- β (14-16)、PDGF-A鎖(17,18)、bFGF(19)の発現を誘導することが示されているが、このことはAng IIがオートクリン様式に他の増殖因子を介して作用していることを示唆している。さらに私たちは、最近、ラット頸動脈バルーン障害モデルにおいて、障害血管のPDGF受容体の活性化がAT1R拮抗薬の投与によって抑制されることを見出している(11)。このことは、Ang IIが障害血管局所においてPDGF-B鎖の発現調節に関わっている可能性を示している。しかし、従来の培養血管平滑筋細胞ではAng II刺激によりPDGF-B鎖の発現は誘導されなかった(17,18)。一方、内膜細胞は、従来より実験に用いられてきた成体ラット大動脈から樹立した平滑筋細胞と比較すると、かなり形質が変換しており、むしろ幼若なラット大動脈の平滑筋細胞に近いことが最近の研究でわ

かってきた。しかし、これらの細胞を用いてPDGFの発現調節を検討した報告はなかった。

本研究の前半では、アデノウイルスによる血管壁への遺伝子導入法を用いて、内膜肥厚におけるPDGF-B鎖の役割を直接的に検討した。この実験ではPDGF- β 受容体の細胞外領域(PDGFR)(20)をコードする遺伝子を含むアデノウイルスベクターを作成した。

PDGFRはPDGF-B鎖のみを捕捉してその活性を阻害する。障害血管におけるPDGFRの発現がPDGF-B鎖の作用を阻害しうるか否か、さらにこの結果、内膜肥厚を抑制するか否かを検討した。後半では、培養内膜平滑筋細胞および、幼若ラットの大動脈から樹立した血管平滑筋細胞を用いて、Ang IIがPDGF-B鎖の発現を調節しているか否かを検討した。さらに、この系を用いてAng IIによるPDGF-B鎖の発現誘導の情報伝達系について検討を加えた。

方法

1) 試薬: PDGFRは、ヒトPDGF- β 受容体の100-117アミノ酸に相当する合成ペプチドを抗原基とした、ヒツジ抗ヒトPDGF- β 受容体ポリクローナル抗体(OA-11-755, Cambridge Research Biochemicals)で認識した。抗PDGF- α 受容体抗体はポリクローナルウサギ抗マウスPDGF- α 受容体抗体(生化学)を、抗PDGF- β 受容体抗体はポリクローナルウサギ抗ヒトPDGF- β 受容体抗体(Upstate Biotechnology; UBI)を、抗EGF受容体抗体はポリクローナルヒツジ抗ヒトEGF受容体抗体(UBI)を、チロシンリン酸化抗体はモノクローナル抗体(4G10, UBI)を使用した。MAPK抗体は、ポリクローナルウサギ抗ERK-2抗体(C14, Santa Cruz Biotech.)、ポリクローナルウサギ抗JNK-1抗体(C17, Santa Cruz Biotech.)、ポリクローナルウサギ抗p38-MAPK抗体(C-20, Santa Cruz Biotech.)を使用した。モノクローナルRas抗体はTransduction Laboratory、モノクローナルPDGF-B抗体は持田製薬のものをを使用した。Ang II, forskolin, sodium nitroprusside, dibutyl cyclic AMP, 8-bromo cyclic GMP, MBPIはSigmaより購入した。CV11974およびPD123319は、それぞれ武田薬品とParke-Davisより譲渡された。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ はDuPont-NENより購入した。pGL2-BasicとpSV-bgalはPromegaより購入した。pGEX-cJun(5-89), pactEF-DN ERK, pGEM-ATF2, pMT-Asn17-HRas, pBS-rPDGF-B, AdenoLacZはそれぞれA.S.Kraft博士(Alabama大), K.Okazaki博士(久留米大), M.R.Green博士(Massachusetts大), J.M.Cooper博士(Harvard大), D.Katayose博士(東北大), I.Saito博士(東大医科研)より提供して頂いた。

2) アデノウイルスの作成: サイトメガロウイルス1Eエンハンサーとトリβ-アクチンプロモーターより成るCAGプロモーターの下流に、ヒトPDGF-β受容体の細胞外領域(PDGFR, アミノ酸残基1-531に相当(20))をコードするcDNAを組み込んだ、複製能力を欠如したアデノウイルス(AdenoXR)を作成した。すなわち、PDGFRをコードする1.8kbのcDNAをpCAGGS由来の発現ベクターpCACCに組み込んだ後、CAGプロモーターとPDGFRcDNAを含む4.2kbのカセットをコスミドpAx1cwに組み込み、アデノウイルスE3欠損変異株Ad5dlxとともに293細胞に遺伝子導入した(21-23)。得られたPDGFR遺伝子陽性ウイルスを単離し、さらに293細胞で増幅後、塩化セシウム法にて精製した。ウイルスは 1×10^{11} pfu/mlに調整した(24,25)。

3) 細胞, および細胞への遺伝子導入: 培養血管平滑筋細胞(SMC)はラット大動脈および頸動脈バルーン障害後の肥厚内膜よりexplant法で樹立した(26)。各細胞は形態的、機能的に血管平滑筋であることを確認した(27-31)。DMEM (Dulbecco's minimal essential medium)に10%のウシ胎児血清とペニシリンおよびストレプトマイシンを加え、 37°C : 5% CO_2 : 95%大気 conditions で維持した。35mm-dishで細胞をコンフルエントにしたのち、 9×10^5 pfu(10 MOI)のアデノウイルスを加え1時間感染させ細胞へ遺伝子を導入した。3日後、培養上清および細胞よりタンパクと総RNAを抽出して、おのおのウエスタンブロット法、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にてPDGFRの発現を確認した。培養上清からは10%トリクロロ酢酸を用いてタンパクを変性回収した。培養上清および細胞から回収したタンパクはLaemmli's sodium dodecylsulfate(SDS)-sample bufferで溶解後、10%SDSアクリルアミドゲルで泳動分離し、Immobilon P膜(Millipore)に転写した。ヒトPDGF-β受容体領域を認

識するヒッジ抗ヒトPDGF- β 受容体ポリクローナル抗体でウエスタンブロットした。

PDGFXRのバンドはPDIデンシトメーターで定量化した。RT-PCR解析は、まず、SMCより総RNAを抽出し、Superscript II reverse transcriptase (GIBCO-BRL)を用いて鋳型となるcDNAを作成した。センスプライマーはヒトPDGF- β 受容体配列1368-1391 (CCTCAAAAGGTGTCCACGTGAGCT)、アンチセンスプライマーはベクター配列 (GGGCATTTGTCCCCATAA)とした。内因性ラットPDGF- β 受容体DNAはこのプライマー対では増幅されない。PCRは94°C0.5分、55°C0.5分、72°C1分を一サイクルとし20サイクル行った。

4) 組換えPDGFXRタンパクの産生と機能解析: PDGFXR cDNAを含む発現プラスミドpCAGGS-XRを、LipofectAMINE (GIBCO-BRL)を用いてCHO-K1細胞にトランスフェクトし、CHO細胞PDGFXR安定発現株を樹立した。その培養上清を採取後濃縮し、wheat germ agglutinin (WGA) Sepharose 6MBにて精製した。精製したPDGFXRタンパクを48穴プレートに固着し、¹²⁵Iで標識されたPDGF-BBを用いて結合実験を行った(20)。同様に、昆虫細胞(Sf9)でも組換えPDGFXR蛋白を産生した。PDGFXR cDNAをpVL1393に組み込みpVL1393XRを作成し、Sf9細胞にpVL1393XRとBaculogold baculovirus DNA (PharMingen)を共同トランスフェクトしてPDGFXR cDNAをコードする組換えバキュロウイルスを作成した(33)。さらにこの組換えバキュロウイルスをSf9細胞に感染させ、培養上清中に産生分泌されるPDGFXRタンパクをWGA Sepharose 6MBで精製した。精製したPDGFXRをSMC培養液に添加し、PDGF-BBによるPDGF- β 受容体チロシンリン酸化および³H-thymidine 取り込み実験を行った(34)。

5) 障害血管壁への遺伝子導入: ウィスターラット (オス、8週令、体重300g) の左外頸動脈からBaxter 2F emborectomy catheterを挿入し、左総頸動脈にバルーン内皮剥離障害術を施行した(11,32,35)。カテーテル挿入部は10-0 monofilament nylon 4針で結節縫合にて閉鎖し、血流を再開させた。①障害直後または5日目に、左総、内および外頸動脈をクランプして血流を遮断し、左外頸動脈からエラスト針を用いて 1×10^{10} pfu/ml 80 μ l のAdenoLacZを血管内腔に40分間封入し、遺伝子を障害血管壁に導入した。ウイルスを除去した後、外頸動脈は結紮し、総および内頸動脈はクランプを解除して血流を再開した。その3日後(障害後8日目)に血管を摘出し、X-gal (5-bromo-4chloro-3indolyl- β -D(-)-galacto-pyranoside)染色を行い、 β -galactosidaseの発現を評価した(7)。遺伝子導入効率はX-gal染色陽性細胞の割合とした。②障害後5日目に、上記と同様に、AdenoXR, AdenoLacZ, AdenoCAまたは溶媒をそれぞれ障害血管内に封入し、遺伝子を導入した。障害後14日目に血管を摘出し、長軸に垂直に切りだし組織切片を作成し、内膜面積、中膜面積、および内膜中膜面積比(I/M比)を計測した(21,32)。同様に、障害後14日目に血管を摘出して組織を溶解後、その上清を各受容体抗体で免疫沈降し、ホスホチロシン抗体および各受容体抗体でウェスタンブロットしてPDGF- α , β 受容体、EGF受容体のチロシンリン酸化と受容体タンパクの発現レベルを測定した(11)。③障害後5日目にAdenoXR, AdenoLacZをそれぞれ障害血管に感染させ、その5日後(障害後10日目)にBromodeoxy-uridine (BrdU)を腹腔内に投与後血管を摘出し、障害血管壁におけるBrdU取り込み能を検討した(36)。

6) PDGF-B鎖のノーザン解析: SMCより

10 μ gの総RNAをacid-guanidium isothiocyanate/phenol/chloroform (AGPC法)で抽出し、1.0%ホルムアルデヒドゲルにより泳動分離後、ナイロン膜(Hybrid N, Amersham)に転写した(26)。ランダムプライマー法を用いてPDGF-B 鎖cDNAプローブを [α - 32 P] dCTPで標識し、ハイブリダイゼーションを行った。PDGF-B鎖プローブはpBS-rPDGF-Bより作成した530bpのcDNAである。バンドの放射性活性はFuji BAS2000 Bio-Image Analyzer (Fuji Film)で定量化した(11,31)。PDGF-B鎖mRNAは対応するGAPDHで補正した。

7) 培養上清中のPDGF-B鎖タンパクのウエスタン解析: 100mm-dishにコンフルエントになったSMCに、Ang II (100nM)を添加して、その36時間後に培養上清を採取し、10%トリクロロ酢酸を用いて上清中のタンパクを変性回収した。17.5%SDS-PAGEにて泳動分離後ナイロン膜に転写し、抗PDGF-B抗体でウエスタンブロットした。

8) MAPキナーゼ (ERK、JNK、p38) 活性化の測定: 細胞溶解物をそれぞれの特異抗体で免疫沈降し、 [γ - 32 P] ATP存在下で各々ミエリン塩基性蛋白(ERK)、GST-c-Jun(JNK)、GST-ATF2(p38)を基質としたin vitro kinase assayを行い、各MAPKの活性を測定した(37)。バンドの放射性活性はFuji BAS2000 Bio-Image Analyzer (Fuji Film)で定量化した(37)。

9) PDGF-B鎖プロモーター活性の測定: 約1.0kbのPDGF-B鎖プロモーター領域(-956~+45)(38)をPCRで作成し、pGL2-basicのNheI-Hind III siteに組込み、レポーターベクターSis-Lucを作製した。LipofectoAMINE(GIBCO)法を用いて、Sis-Lucと各

優性抑制型MAPK発現ベクター(DN-ERK; pactEF-ERK-D170A, DN-JNK; pME18S-JNK1-T183A,Y185F, DN-p38; pME18S-p38-T180A,Y182F) (39,40)もしくは空ベクター(pME18S, pactEF)をコ・トランスフェクトした。細胞は3時間10%胎児血清を添加したDMEMで回復させ、その後48時間血清除去した。細胞を溶解後、Luciferase assay system(Promega)を用いてLumat LB95001 Luminometer (Berthold)でルシフェラーゼ活性を計測した。その測定値は、同時に β -galactosidase発現プラスミド pSV-bgalと各優性抑制型MAPK発現ベクターをコ・トランスフェクトして測定したルシフェラーゼ活性値によって補正した。

結果

1. PDGFRによる内膜肥厚の抑制

1) PDGFR発現の確認とその機能解析

培養血管平滑筋細胞 (SMC) にAdenoLacZおよびAdenoXRを感染させた。3日後に細胞より AGPC法を用いて総RNAを抽出し、RT-PCR法を用いてPDGFRmRNAの発現を確認した。同様に、細胞または培養上清よりタンパクを回収後、泳動分離し、PDGF- β 受容体の細胞外領域を認識する特異抗体を用いたウエスタンブロットを施行してPDGFRタンパクの発現を確認した。PDGFRmRNAの発現は、AdenoXR感染SMCでのみ認められ、AdenoLacZ感染SMCでは認められなかった。また、 β -actinのmRNAの発現レベルには両者に差を認めなかった (Fig. I-1A)。PDGFR DNAはRT-PCRでは増幅されなかった。一方、PDGFRタンパクはAdenoXR感染SMCの培養上清から検出されたが、AdenoLacZ感染SMCの培養上清からは検出されなかった (20)。PDGFRタンパクは、AdenoXR感染SMCの細胞内には検出できる量は存在しなかった (Fig. I-1B)。このことよりAdenoXRの感染により培養SMCはPDGFRタンパクを産生するようになり、その大部分は細胞外に分泌されることが明らかとなった。次に、AdenoXR感染SMCより産生分泌されるPDGFRタンパク量の時間経過を調べた。PDGFRタンパクは感染後1日目より検出され、2日目にはほぼ最大に達し、その後徐々に低下したが感染後10日目でも分泌は確認された (Fig. I-1C)。

次に、PDGFRのPDGFに対する結合の特異性を調べた。組換えPDGFRタンパクを48穴プレートに固着後、¹²⁵I標識PDGF-BBとPDGFRの結合が非標識PDGFおよびEGFによ

って抑制されるか検討した。Fig. 1-2Aに示すように非標識PDGF-BBは¹²⁵I標識PDGF-BBとPDGFRの結合を濃度依存性に抑制した。それに対し非標識PDGF-AAおよび非標識EGFでは抑制は認められなかった。

さらに、PDGFRが*in vitro*でPDGF-BBによる機能を抑制するか検討した。培養SMCではPDGF-BBによりPDGF-β受容体のチロシンリン酸化レベルが増加する。この作用は組換えPDGFRをSMCの培養上清に加えると、ほぼ完全に抑制された(Fig. 1-2B)。さらに、PDGF-BBによるDNA合成能の上昇もPDGFRにより完全に抑制された(Fig. 1-2C)。すなわちPDGFRは*in vitro*でPDGF-BBによる機能を抑制することが示された。

2) 障害血管壁への遺伝子導入効率の検討

最近、ラット頸動脈バルーン障害モデルにおいて、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は、障害直後より障害後3から7日目に飛躍的に上昇することが報告された(41)。そこで、バルーン障害直後と障害後5日目にAdenoLacZを血管内に封入し、血管壁への遺伝子導入効率が上昇するか確認した(Fig. 1-3AとB)。障害後5日目に遺伝子導入した血管では、内膜細胞の90%以上にLacZの発現が認められ、最内層の中膜平滑筋細胞も一部LacZの発現が認められた。一方、障害直後に遺伝子導入した血管では、表層のごく僅かな中膜平滑筋細胞にLacZの発現が認められたのみであった。さらに、障害後5日目に投与するAdenoLacZの濃度(力価)を検討すると、従来、報告されていたように、 1×10^{10} pfu/mlで遺伝子導入効率が最大となった(24)。従って、以後の実験は、障害後5日目に 1×10^{10} pfu/mlのアデノウイルスを血管内に投与することにした。実際、このプロトコールでAdenoXRとAdenoLacZを投与すると、AdenoXR感染血管のみにPDGFR

mRNAが検出された。この時、 β -actinのmRNAの発現レベルには差を認めなかった (Fig. I-1A)。

3) PDGFRによる内膜肥厚の抑制

1×10^{10} pfu/mlのAdenoXR, AdnoLacZまたはAdenoCA (外来遺伝子を含まないアデノウイルス) を、バルーン障害後5日目のラット頸動脈に感染させ遺伝子を導入した。ウイルス感染自体の影響を検討するため、溶媒(DMEM)のみの投与群 (アデノウイルス非感染 (内皮剥離障害 (+)) 群) も作成した。障害後14日目に血管を摘出し、内膜面積、中膜面積および内膜・中膜面積比 (I/M 比) を測定した。内膜面積はAdenoXR感染群でのみ抑制されており、中膜面積は各群の間に差を認めなかった。つまり、Adeno-LacZ感染群、AdenoCA感染群、アデノウイルス非感染 (内皮剥離障害 (+)) 群と比較してAdenoXR投与群では内膜肥厚が著明に抑制されていた (Fig. I-4)。定量的に解析すると、AdenoXR投与群のみ有意に内膜形成が抑制され、I/M 比においてAdenoXR投与群はアデノウイルス非投与 (内皮剥離障害 (+)) 群の45%であり、55%の有意な内膜肥厚の抑制が認められた (Fig. I-5)。AdenoLacZ群と比較するとI/M 比で43%であり57%の有意な抑制が認められた (Fig. I-5)。ウイルス感染自体による内膜細胞や細胞外マトリックスなどの形態変化はなく、さらにAdenoXRの投与によっても形態変化は認められなかった。

次に、PDGFR発現によってPDGF- β 受容体の活性化が抑制されているか検討した。以前私たちは、PDGF- α 、 β 両受容体のチロシンリン酸化レベルは障害血管において非障害血管の3-4倍増加していること、そして、EGF受容体のチロシンリン酸化レベルは変わら

ないことを報告した(11)。今回も同様に、障害後14日目の血管を摘出し検討してみると、AdenoLacZ感染血管において、PDGF- β 受容体のチロシンリン酸化レベルは非障害血管の4倍に上昇していた。一方、AdenoXR感染血管では非障害血管レベルまで抑制されていた(Fig. I-6AとB)。PDGF- β 受容体の発現レベルは、非障害血管、AdenoLacZ感染血管、AdenoXR投与血管の間に差を認めなかった(Fig. I-6AとC)。さらに、PDGFRの発現がPDGF- α 受容体やEGF受容体の活性化に影響を与えているか検討した。PDGF- α 受容体のチロシンリン酸化レベルも、PDGF- β 受容体の場合と同じく、AdenoLacZ投与血管では非障害血管の3倍に増加していたが、AdenoXR投与血管では非障害血管のレベルまで抑制されていた(Fig. I-7AとB)。一方、EGF受容体のチロシンリン酸化レベルはAdenoLacZ感染によって影響されなかったが、これはAdenoXR感染によっても同じであった(Fig. I-7AとC)。PDGF- α 受容体とEGF受容体の発現レベルは、非障害血管、AdenoLacZ投与血管、AdenoXR投与血管の間に差を認めなかった(Fig. I-7)。つまり、PDGFRは、PDGF- α 、 β 両受容体の活性化を抑制するが、EGF受容体の活性には影響しないことが示された。

最後に、PDGFRの発現が、障害血管内で平滑筋の増殖を抑制するか検討した。障害後5日目にAdenoXRまたはAdenoLacZを投与し、その5日後(障害後10日目)にBrdUを腹腔内に投与し血管を摘出すると、AdenoXR感染血管ではAdenoLacZ感染血管に比べ内膜のBrdU陽性細胞はほぼ40%に抑制されていた。中膜でのBrdU陽性細胞もAdenoXR感染血管で減少していた(Fig. I-8)。

II. Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現とその情報伝達系の解明

1) 幼若なラットSMCおよび内膜SMCにおける, Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現誘導

幼若なラット大動脈より樹立したSMC (newborn rat SMC) は、静止期でもPDGF-B鎖mRNAを僅かながら発現していた (Fig. II-1A)。10nMのAng IIで刺激すると、PDGF-B鎖mRNAは著明に増加し、4時間後には最大値に達した。その後徐々に減少して24時間後には刺激前のレベルに戻った。Ang II刺激によりGAPDH遺伝子発現レベルは変わらなかった。肥厚内膜より樹立した内膜SMC (neointimal SMC) でもAng II刺激によりPDGF-B鎖mRNAの発現誘導が引き起こされた (Fig. II-1B)。それに対し、成体ラット大動脈より樹立したSMC (adult rat SMC) は静止期においてPDGF-B鎖mRNAの発現は検出できず、Ang II刺激によってもPDGF-B鎖mRNAの発現誘導は認められなかった (Fig. II-1C)。newborn rat SMCにおけるPDGF-B鎖mRNAの発現誘導は、Ang IIの濃度に依存して増加し、10nMでほぼ最大となった (Fig. II-2AとB)。この作用は、AT1受容体特異的拮抗薬CV11974で完全に抑制されたが、AT2受容体特異的拮抗薬PD123319では抑制されず、AT1受容体を介した反応であることが示された (Fig. II-3)。

次にAng IIがPDGF-Bタンパクの産生を促すか検討した。newborn rat SMCをAng IIで刺激し、その培養上清のタンパクを回収してPDGF-B抗体でウエスタンブロットすると、PDGF-Bタンパクの位置に一致してバンドが検出された。このバンドはAng II刺激によって増強し、さらにPDGF-BでPDGF-B抗体を吸収しておくで消失した。このことよりAng II刺激によってPDGF-Bタンパクが産生されることが示された (Fig. II-4)。

2) PDGF-B鎖遺伝子発現におけるERKおよびJNK依存性

Newborn rat SMCを100nMのAng IIで刺激すると、ERKが活性化された。その活性化は刺激後7分で刺激前の7倍になり、60分でほぼ刺激前の状態に戻った (Fig. II-5 A と B)。さらに、Ang IIは他の2つのMAPKファミリーであるJNKとp38も活性化したが、その活性化の程度はERKに比べ弱かった。Ang IIによるERK, JNK そしてp38の活性化はAT1受容体拮抗薬CV11974で完全に抑制されたが、AT2受容体拮抗薬PD123319では抑制されなかった。つまりこのことはAng IIによる3つのMAPK (ERK, JNK, p38) の活性化はAT1受容体を介した反応であることが判った。MEK阻害剤であるPD98059 (30 μ M) によって、Ang IIによるPDGF-B鎖mRNAの発現はほぼ完全に抑制された (Fig. II-6 A)。同じ条件でPD98059を作用させるとAng IIによるERK活性化は非常に強く抑制されていた (Fig. II-6 B)。一方、p38特異的阻害剤であるSB203580 (10mM) は、Ang IIによるPDGF-B鎖mRNAの発現を抑制しなかった。

次に、Ang IIがPDGF-B鎖遺伝子の転写活性を上昇させるか否か検討した。まず、PDGF-B鎖のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに組み込み、レポーターベクター:Sis-Lucを作製した。newborn rat SMCにSis-Lucをトランスフェクションし、Ang IIで刺激するとルシフェラーゼ活性が約2倍に上昇した (Fig. II-7)。このことよりAng IIはPDGF-B鎖遺伝子の転写活性を上昇させることがわかった。さらに、Sis-LucとともにMAPKの各優性抑制型発現ベクターをトランスフェクションすると、Ang II刺激によるルシフェラーゼ活性の上昇は、優性抑制型ERKと優性抑制型JNKの発現により抑制された。一方、優性抑制型p38の発現による抑制作用は認められなかった (Fig. II-7)。

3) ERK活性化とPDGF-B鎖遺伝子発現におけるRas依存性

次に、Ang IIによるMAPK活性化およびPDGF-B鎖遺伝子発現のRas依存性を検討した。newborn rat SMCに、優性抑制型Ras (Asn 17-H Ras) またはLacZの各cDNAを組み込んだアデノウイルス (各AdenoDN-Ras, AdenoLacZ) を感染させると、AdenoDN-Rasを感染させた細胞のみ、著明な優性抑制型Rasの発現を認めた (Fig. II-8A)。さらに、AdenoLacZを感染させた細胞ではAng II刺激によりERKとJNKの活性化 (Fig. II-8B)、およびPDGF-B鎖mRNA発現 (Fig. II-8C) が認められたが、AdenoDN-Rasを感染させた細胞ではERK活性化 (Fig. II-8B) およびPDGF-B鎖mRNA発現 (Fig. II-8C) は強く抑制されていた。一方、JNK活性化は影響されなかった (Fig. II-8B)。

3) サイクリックヌクレオチドによるPDGF-B鎖遺伝子発現誘導の抑制

ForskolinまたはcAMP膜透過性誘導体dibutyl cAMP (dbcAMP) を添加するとAng IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現はほぼ完全に抑制された。sodium nitroprusside (SNP) またはcGMP膜透過性誘導体8-bromo cGMP (8bcGMP) を添加しても同様の作用がみられた。この時dbcAMP、8bcGMPともに、Ang IIによるERKとJNKの活性化を抑制していた。

考察

本研究では、動脈損傷後の内膜肥厚の形成におけるPDGF-B鎖の関与を直接的に検討するため、PDGF-B鎖の作用を特異的に阻害するPDGFRを血管壁局所に発現させ、内膜肥厚が抑制されるか、そして、それとともに、PDGF受容体の活性化が抑制されるか否かを検討した。遺伝子を導入する方法として、アデノウイルスベクターを用いて(41)、血管障害後5日目に血管壁へ遺伝子を導入することにした。既に私たちは、ラット頸動脈モデルを用いて、障害後早い時期(障害後4~5日以内)よりも内膜形成が著明に進行する時期(障害後5~14日目)にPDGF受容体が活性化されていることを見出している(11)。また、障害直後より障害後数日目のほうがアデノウイルスによる遺伝子導入効率が上昇するという報告がされている(42,43)。従って、障害後5日目に遺伝子を導入することはPDGFの活性を十分に抑制するため合理的な手段と考えられた。実際、障害後5日目にアデノウイルスを投与することにより飛躍的に遺伝子導入効率が上昇し、90%以上の内膜平滑筋細胞に遺伝子が導入された。一方、中膜平滑筋細胞には、最内層の細胞の一部に遺伝子が導入されたのみであった。内膜と中膜に存在する平滑筋細胞間でアデノウイルスによる遺伝子導入効率に差がある理由は不明である(42)。あるクラスのインテグリンはアデノウイルスの細胞への侵入経路として関与している可能性が報告されている(44)ことから、内膜細胞と中膜細胞に発現しているインテグリンのクラスの違いが感染効率の差異の原因である可能性が考えられる。

内膜肥厚に関与するPDGFの重要性については、既にFernsらが報告している(10)。すなわち、ラット頸動脈バルーン障害モデルを用いて、抗PDGF抗体を7日間持続注入し

PDGFの作用を抑制すると、8日目の時点での内膜肥厚が抑制されるというものである。

しかし、この報告ではPDGFのすべてのアイソフォームに対する抗体を用いていたが、本研究ではPDGFRにより選択的にPDGF-B鎖の作用を阻害し、PDGF-B鎖の役割に限定して検討した。PDGFRの発現により障害血管内のPDGF受容体の活性化と内膜肥厚が著明に抑制されたことから、本研究で初めて、PDGF-B鎖が内膜肥厚の形成の上で重要な働きをしていることが明らかとなった。さらに、PDGFRの発現により、障害血管におけるPDGF- α , β 両受容体の活性化が抑制されたことは、PDGF- α 受容体の活性化もPDGF- β 受容体と同様に、PDGF-B鎖に因るものであることを示している。最近、Siroisらもアンチセンスオリゴヌクレオチドを局所投与することでPDGF- β 受容体の発現を抑制し、内膜肥厚を抑制することができたと報告した(45)。PDGF- α 受容体とPDGF-A鎖の内膜肥厚における役割は未だ解明されていないが、本研究とSiroisらの報告より、PDGF-B鎖とPDGF- β 受容体は内膜肥厚において極めて重要な働きをしていることが明らかとなった。また、それと同時に、PDGFRがPDGF-B鎖の作用を*in vivo*でも十分に阻害し得ることより、PDGFRがPDGF-B鎖が関与する他の疾患においても有力な治療手段となり得ることが予想された。

PDGF-B鎖は、*in vitro*では強力な増殖・遊走因子である。しかし、Fernsらの報告では、抗PDGF抗体の投与によって障害後8日目のラット頸動脈の内膜・中膜の平滑筋細胞のDNA合成能は低下せず、障害後第一週におけるPDGFの作用は中膜平滑筋細胞の内膜への遊走である、と結論づけている(10)。それに対し、本研究では、主として障害後第二週におけるPDGF-B鎖の作用を阻害した。PDGFR群では、障害後10日目のBrdU陽性内膜細胞は、LacZ群の40%に減少しており、このことは障害後第二週のPDGF-B鎖は平滑

筋細胞の増殖に関与していることを示している。しかし、このことは、障害後第二週のPDGF-B鎖の作用に遊走促進作用があることは否定していない。

本研究では、PDGF-B鎖の作用を阻害することにより内膜肥厚を著明に抑制することができたが、ラットモデルに限っても、その他の様々な増殖因子が内膜肥厚に関与していることは既に知られている(46-48)。PDGFがヒトの内膜肥厚において重要であることを示唆する報告(49)は既にあるが、ラットモデルより複雑な病態が複合してできると考えられているヒトの内膜肥厚の病態解明については、更なる検討が必要である。

本研究ではさらに、障害血管におけるPDGF-B鎖の遺伝子発現調節について検討した。PDGFと同様、Ang IIも内膜肥厚に関与するという報告がある(3,11-13,50,51)。また、私たちは、障害血管におけるPDGF- β 受容体の活性化はAT1R拮抗薬で抑制されることを見出している(11)。このことは、*in vivo*においてAng IIとPDGF-B鎖が直接関連していることを示唆しており、Ang IIが血管局所においてPDGF-B鎖の産生を促している可能性を示すものであった。しかし、既に報告されているように、成体ラットの大動脈より樹立した培養血管平滑筋細胞 (adult rat SMC) では、Ang II によるPDGF-BmRNAの発現誘導は証明できなかった(17,18)。一方、内膜細胞 (neointimal SMC) は、中膜平滑筋細胞と比べ形質が変化していることが知られており(29)、形態上そして遺伝子発現上、adult rat SMCより幼若なラット大動脈より樹立した平滑筋細胞 (newborn rat SMC) に近いことが指摘されている(30,31)。本研究ではneointimal cellとnewborn rat SMCではAng IIがPDGF-B鎖遺伝子の発現を誘導することを示した。一方、障害血管ではrenin、angiotensinogen、ACE、AT1RのmRNAが増加しているという報告がある(52-54)。つまり、これらの結果は、障害血管では局所のアンギオテンシン系がAT1Rを介して内膜でのPDGF-B鎖遺伝子発現を誘導していることを示唆している。

次に、本研究ではAng IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現誘導の情報伝達系について検討を加えた。adult rat SMC同様、newborn rat SMCでも、MAPKつまりERK、JNK、p38すべてを活性化した(55)。MAPKは、細胞外情報を核に伝え、遺伝子を発現させる上で重要とされる(56)。従って、さらにAng IIのPDGF-B鎖遺伝子発現における各MAPKの関与を調べた。各MAPKの優性抑制型発現ベクターをトランスフェクトし、Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子の転写活性を調べると、転写活性はERK、JNKの優性抑制型発現ベクターにより抑制されたが、p38の優性抑制型発現ベクターでは抑制されず、ERK、JNKがAng IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現に関与していることがわかった。最近、ホルボールエステルや内皮障害により、Egr-1とcis-acting elementの結合がおこりPDGF-B鎖遺伝子転写活性が上昇することが示されている(57,58)。実際、私もAng II刺激によりEgr-1 mRNA発現が早期に誘導されること、そして、この反応はMEK阻害剤PD98059により抑制されることを見出している。

最近、Ang IIが低分子量G蛋白Rasを活性化するという報告がある(59-61)。RasはRafを介しERKを活性化する上で重要な蛋白である。従って、本研究ではさらに、Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現においてRasの関与を調べた。アデノウイルスベクターにより優性抑制型Ras (DN-Ras)を発現させると、Ang IIによるERK活性化は抑制された。Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現がERK依存性であることと同様に、DN-Rasの発現でもAng IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現は完全に抑制された。

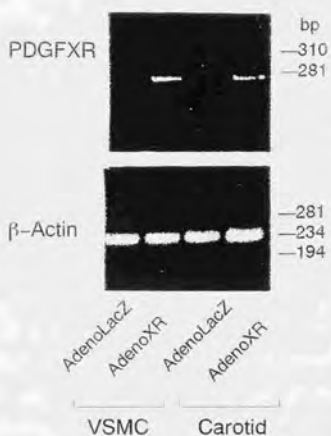
ラット頸動脈バルーン障害モデルにおいて、正常内皮が形成されると内膜肥厚の形成が止まる(62)など、血管壁細胞の増殖・遊走や形質変換に一酸化窒素(NO)の産生異常が関与していると考えられている(63,64)。血管壁では、NOは主として内皮細胞で産生され、平滑筋細胞に作用し、グアニル酸シクラーゼを活性化しサイクリックGMPを増加させる

と考えられている。一方、サイクリックAMPも、Ras依存性のERK活性化を抑制することによりDNA合成能を阻害したり、内皮細胞ではPDGF-B鎖遺伝子発現を抑制するなど、細胞内情報伝達系レベルで遺伝子発現調節を行なっていることが報告されている(65,66)。そこで私は、newborn rat SMCを用いて、Ang IIによるPDGF-B鎖遺伝子発現調節にサイクリックヌクレオチドが関与しているか検討した。本研究では、サイクリックAMP誘導体およびサイクリックGMP誘導体はともに、Ang IIによるERKとJNKの活性を抑制し、PDGF-B鎖遺伝子発現を抑制した。このことは、サイクリックヌクレオチドは障害血管において、PDGF-B鎖遺伝子発現を制御することにより内膜肥厚を抑制していることを示唆している。

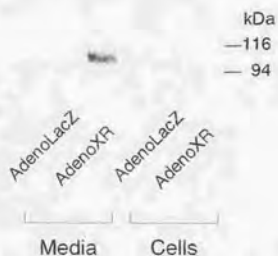
結論

内因性PDGF-B鎖が内膜肥厚の形成において重要な役割をはたしていることが明らかとなった。さらに、PDGF-B鎖は内膜平滑筋細胞で産生され、アンギオテンシンIIによる調節を受けていることが示唆された。

A



B



C

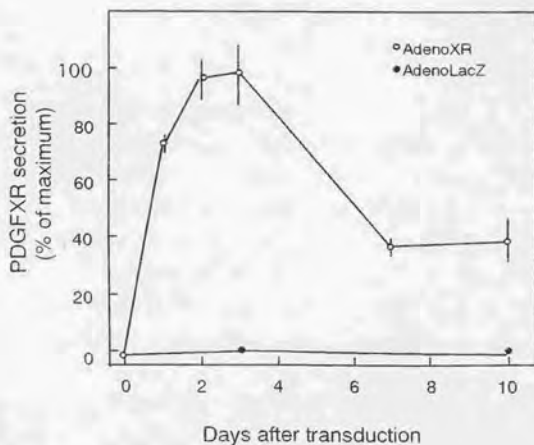
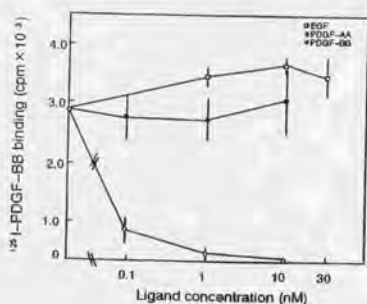


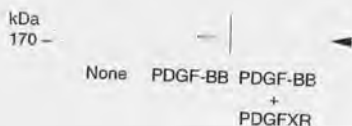
Fig. I-1. PDGFR mRNAとタンパクの発現

- A. SMCをラット頸動脈にAdenoLacZまたはAdenoXRを感染させ、3日後に総RNAを抽出し、RT-PCR法にて解析した。さらに、同じサンプルを用いて β -actin mRNAの発現も調べた。AdenoXRを感染させたSMCおよび頸動脈にPDGFR mRNAが検出された。
- B. SMCにAdenoLacZまたはAdenoXRを感染させ、細胞および培養上清をよりタンパクを回収し、ヒトPDGF-b受容体細胞外領域を認識する抗体でウエスタンブロットした。AdenoXR感染SMCの培養上清にPDGFRタンパクが検出された。
- C. SMCにAdenoLacZまたはAdenoXRを感染させ、培養上清に分泌されるPDGFRタンパクの時間経過を測定した。培地を交換して24時間後の培養上清からトリクロロ酢酸でタンパクを変性回収し、ウエスタンブロット法にてPDGFRタンパク発現量を測定した。最大分泌量を100%としその割合で表記した。AdenoXR感染SMCは、感染後3日目で産生分泌が最大となり、10日後も分泌は続いた。AdenoLacZ感染SMCは、PDGFRタンパクは産生分泌しなかった。○は、AdenoLacZ感染SMCより分泌されたPDGF-XRタンパクを、●はAdenoXR感染SMCより分泌されたPDGFRタンパクを示す。

A



B



C

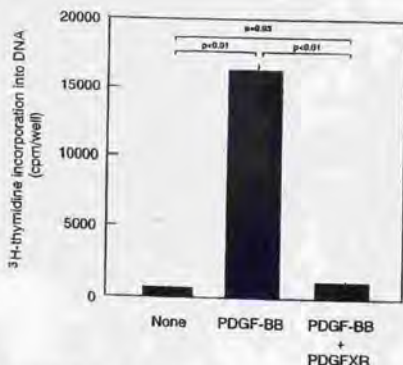


Fig. 1-2. PDGFRタンパクの機能解析

A. PDGFRタンパクとPDGF-B鎖の結合特異性；組換えPDGFRタンパクを48穴プレートに固着した後、非標識PDGF-BB, PDGF-AA, EGF存在下で、 125 I標識PDGF-BBとPDGFRタンパクの結合が抑制されるか調べた。非標識PDGF-BBのみ 125 I標識PDGF-BBとPDGFRタンパクの結合を抑制した。

B. PDGFRタンパクによるPDGF- β 受容体のチロシンリン酸化の抑制；SMCをPDGF-BB (10ng/ml)刺激後、抗PDGF- β 受容体抗体で免疫沈降して抗ホスホチロシン抗体でプロットした。PDGFR(8nM)により、PDGF-BBによるPDGF- β 受容体のチロシンリン酸化が抑制された。

C. PDGFRタンパクによるDNA合成能の抑制；SMCをPDGF-BB(30ng/ml)で刺激後、24時間後のチミチンの取り込み能をパルスラベルした。PDGFRタンパク(16nM)によりPDGF-BBによる $[^3\text{H}]$ -thymidine (1mCi/ml)の取り込み能が抑制された。

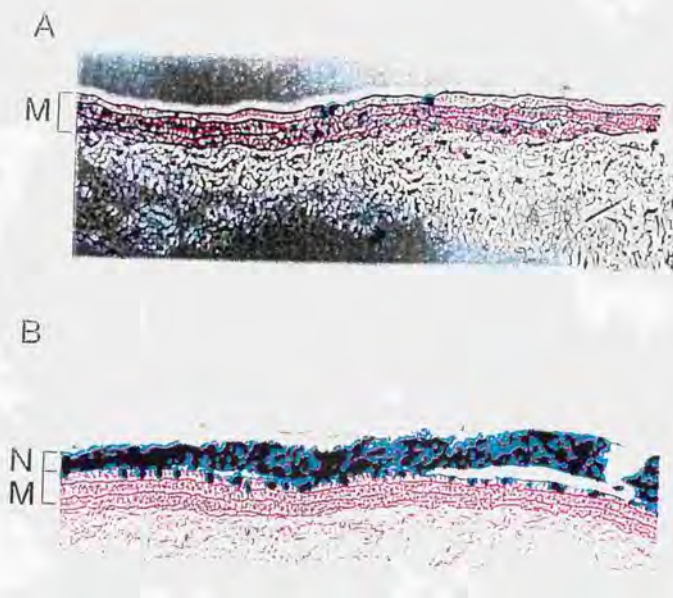


Fig. 1-3. 頸動脈への遺伝子導入効率の検討

ラット左総頸動脈に内皮剥離障害術を施行し、AdenoLacZを障害直後(A)または障害後5日目(B)に感染させ遺伝子を導入した。各々感染後3日目(Aは障害後3日目, Bは障害後8日目)に血管を摘出し、Hematoxylin-eosin(HE)でカウンター染色をした後、X-gal染色にてLacZ遺伝子導入効率を調べた。(B)の内膜細胞はほぼ100% β -gal陽性であった。倍率はX100。Nは新生内膜, Mは中膜を示す。

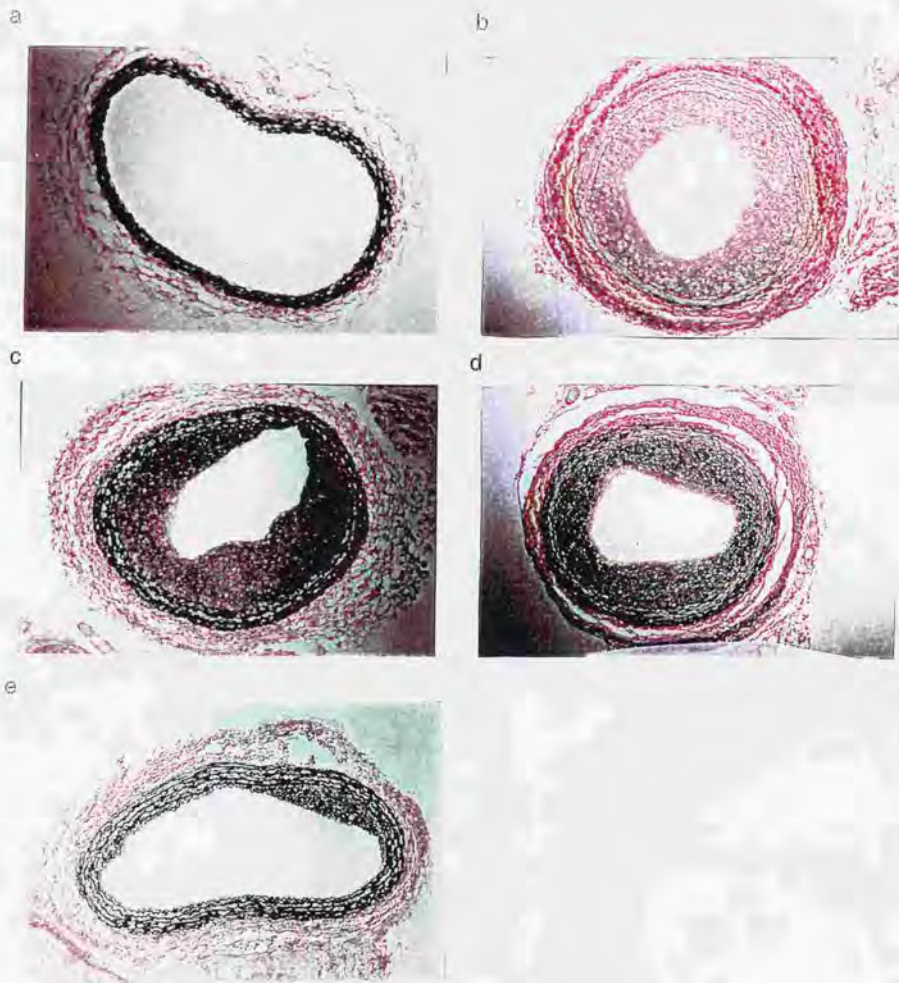


Fig. 1-4. AdenoXR感染血管の内膜肥厚の抑制

a. 正常血管 b. ウイルス非感染群（内膜剥離障害(+)） c. AdenoLacZ感染群 d. AdenoCA感染群 e. AdenoXR感染群。b,c,d,eはバルーンカテーテルによる内皮剥離障害を施行し、障害後5日目にウイルスを感染させ、障害後14日目に血管を摘出して組織切片を作製した。AdenoXR感染群は内膜肥厚が抑制されている。倍率はX30。Elastica van Giesonにて染色した。

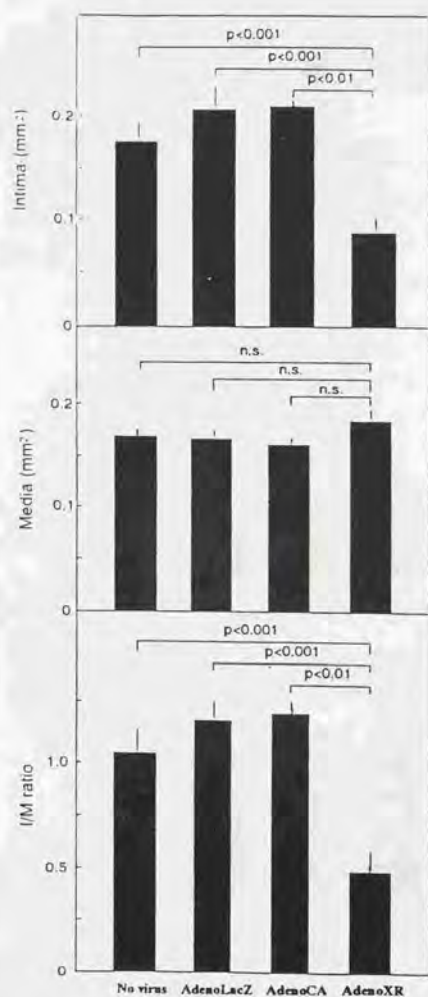


Fig. I-5. 内膜面積, 中膜面積, 内膜・中膜面積比の定量結果
 左よりNo virus; ウイルス非感染群(内膜剥離障害(+)), AdenoLacZ; AdenoLacZ感染群, AdenoCA; AdenoCA感染群, AdenoXR; AdenoXR感染群。上段は内膜面積(mm²), 中段は中膜面積(mm²), 下段は内膜・中膜面積比(I/M ratio)。AdenoXR投与群のみ内膜面積が有意に抑制され, I/M比も抑制されていた。

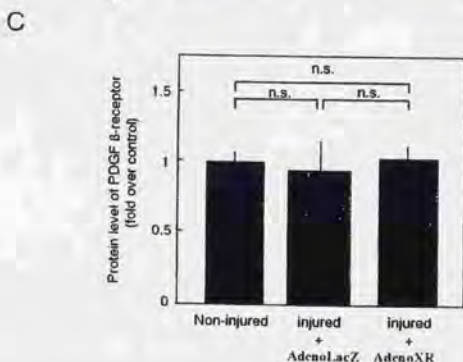
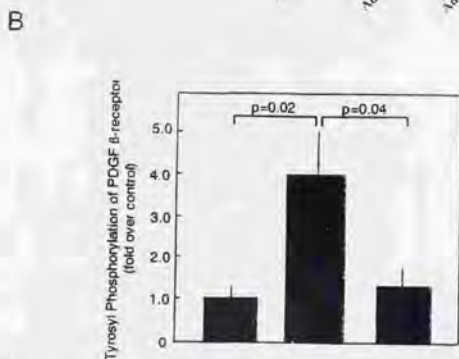
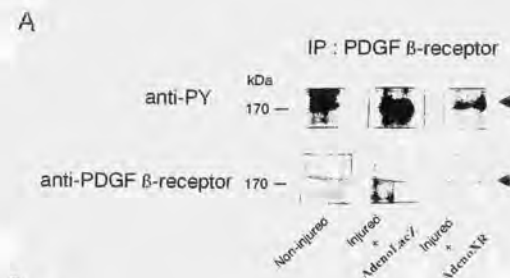


Fig. I-6. PDGFR発現によるPDGF- β 受容体活性化の抑制

A. 抗ホスホチロシン抗体(anti-PY)および抗PDGF- β 受容体抗体でのウェスタン解析。正常血管(Non-injured)、AdenoLacZ感染血管、AdenoXR感染血管をホモジナイズし抗PDGF- β 受容体抗体でPDGF- β 受容体を免疫沈降し、8%SDS-PAGEで泳動分離後、上記抗体でプロットした。PDGFRの発現によりPDGF- β 受容体のチロシンリン酸化レベルは抑制された。B. PDGF- β 受容体のチロシンリン酸化の定量結果。C. PDGF- β 受容体の発現の定量結果。ともに、正常血管と比較して、その倍率で表記してある。

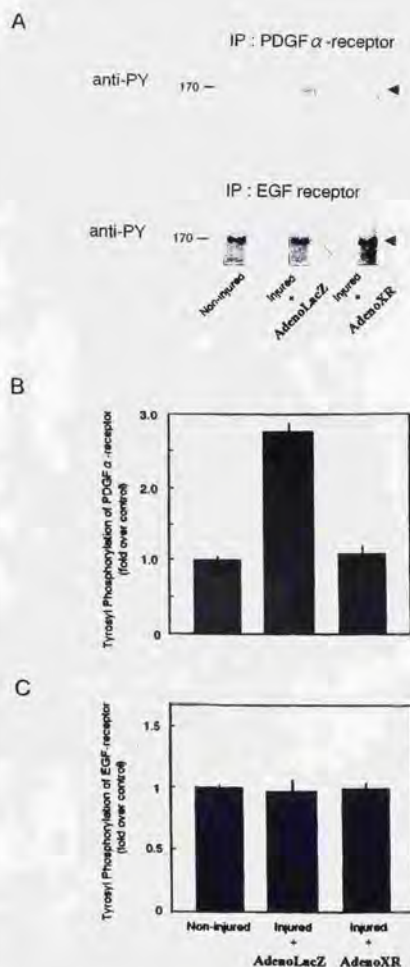


Fig. 1-7. PDGFR発現によるPDGF- α 受容体活性化の抑制

A. 正常血管 (Non-injured)、AdenoLacZ感染血管、AdenoXR感染血管をホモジナイズし、特異抗体でPDGF- α 受容体またはEGF受容体を免疫沈降し、8%SDS-PAGEで泳動分離後、抗ホスチロシン抗体(anti-PY)でプロットした。PDGFRの発現によりPDGF- α 受容体のチロシンリン酸化レベルは抑制されたがEGF受容体のチロシンリン酸化レベルは変化しなかった。

B. PDGF- α 受容体のチロシンリン酸化の定量結果。C. EGF受容体のチロシンリン酸化の定量結果。各々、正常血管と比較して、その倍率で表記してある。

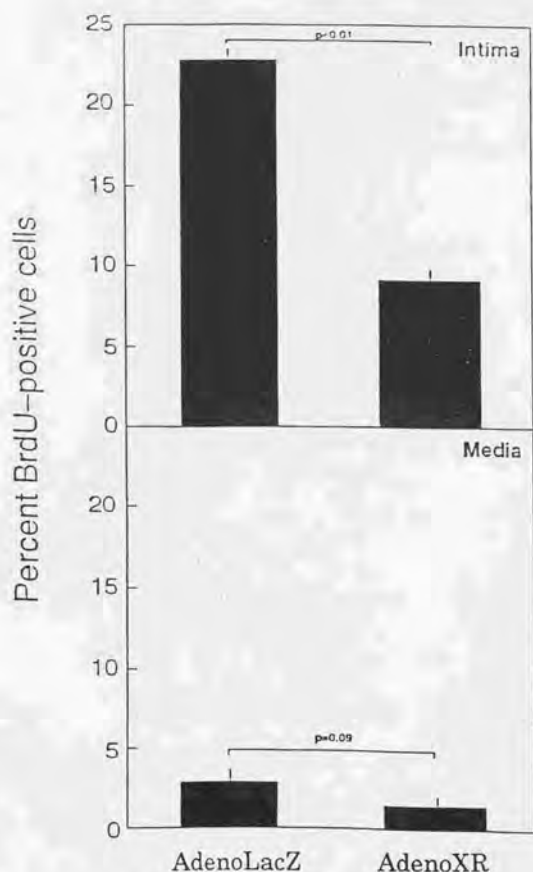


Fig. 1-8. PDGFXR発現による、内膜および中膜平滑筋増殖の抑制

内皮剥離障害後5日目にAdenoLacZまたはAdenoXRを感染させ、障害後10日目にbromo-deoxyuridineを腹腔内に投与後、血管を摘出した。長軸に垂直に組織切片を作成し、抗BrdU抗体で組織染色した。グラフは細胞全体中のBrdU陽性細胞の割合である。内膜でも中膜でもPDGFXR発現によりBrdU陽性細胞の割合は抑制されていた。

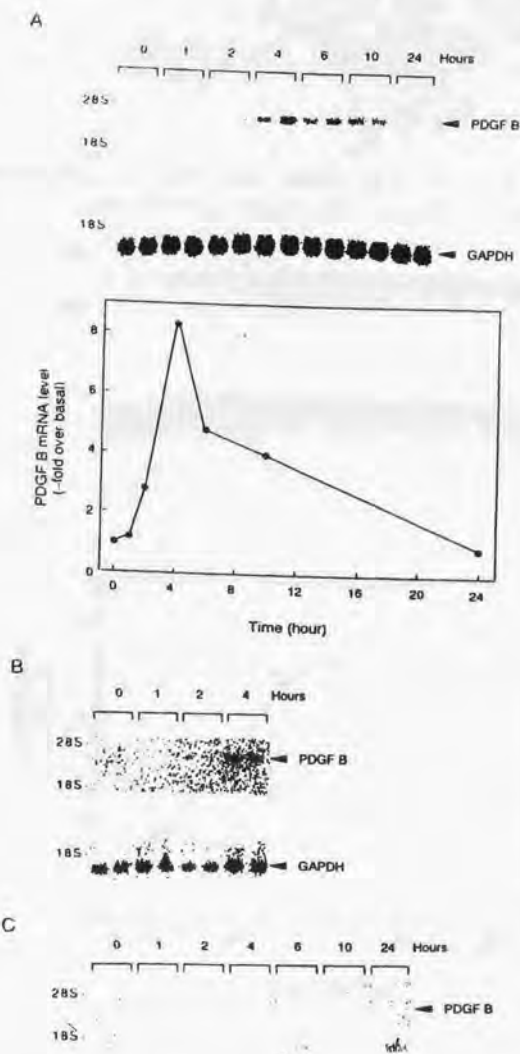
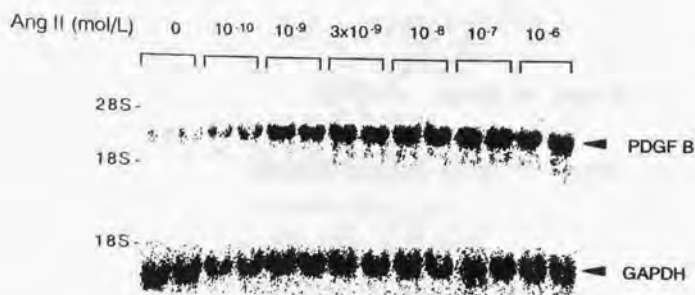


Fig. II-1. newborn rat SMC、neointimal SMCおよびadult rat SMCにおけるAng II刺激によるPDGF-B鎖mRNA発現の時間経過。
newborn rat SMC (A)、neointimal SMC (B)およびadult rat SMC (C)をAng II (100nM)で刺激し、PDGF-BおよびGAPDHのmRNAの発現をノーザンブロットで検討した。Aの下段は上段オートラジオグラフの定量結果。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激時の値を基準としてその倍率で表記した。

A



B

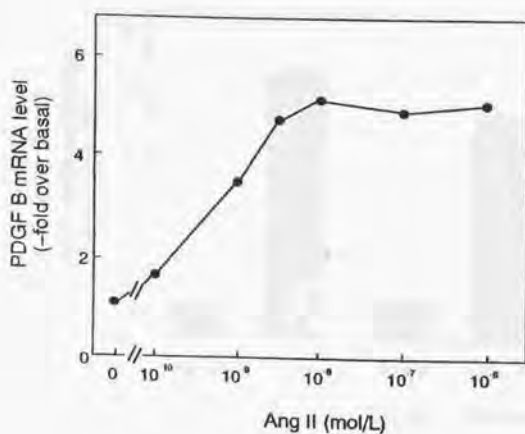
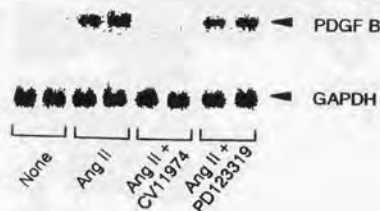


Fig. II-2. Ang IIの濃度に依存したPDGF-B鎖mRNA発現誘導。

newborn rat SMCを各濃度のAng IIで4時間刺激し、PDGF-B鎖およびGAPDHのmRNAの発現をノーザンブロットで検討した。A. オートラジオグラフ、B. 定量結果。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激時の値を基準としてその倍率で表記した。

A



B

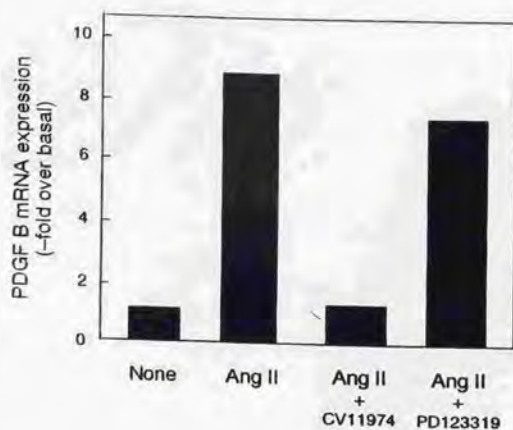


Fig. II-3. Ang II によるPDGF-B鎖mRNAのAT1R依存性。

CV11974(1mM)またはPD123319(1mM)存在、非存在下で、newborn rat SMCをAng II(100nM)で4時間刺激し、PDGF-B鎖およびGAPDHのmRNA発現をノーザンブロットで検討した。A. オートラジオグラフ、B. 定量結果。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激時の値を基準としてその倍率で表記した。

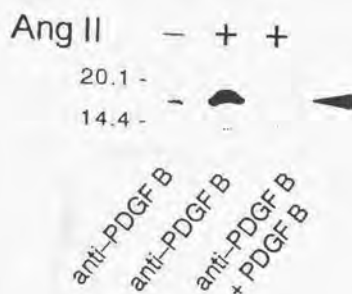
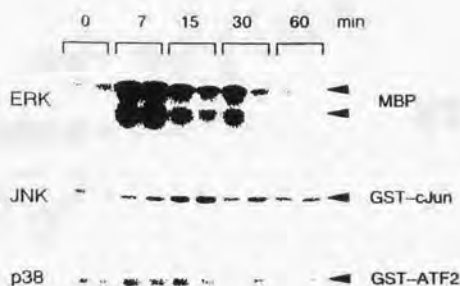


Fig. II-4. Ang II によるPDGF-Bタンパクの産生。

newborn rat SMCをAng II (100nM)刺激し、36時間後に培養上清を回収して、PDGF-Bタンパクの発現を確認した。各レーンは抗PDGF抗体(anti-PDGF B)とPDGF-Bで3時間インキュベートさせた抗PDGF抗体(anti-PDGF B+PDGF B)でプロットした。矢印はPDGF-B鎖の位置。

A



B

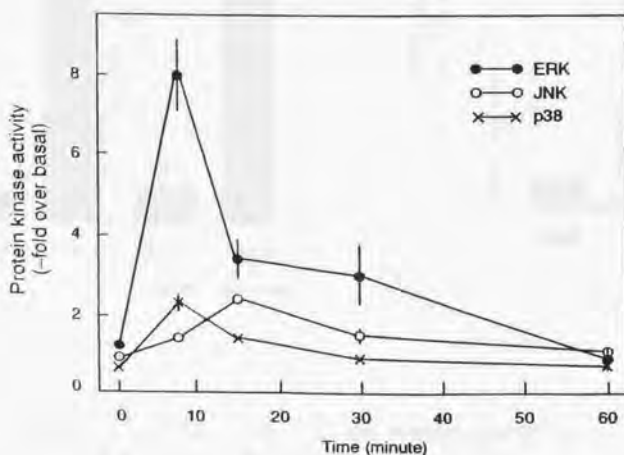


Fig. II-5. Ang IIによるERK,JNK,p38の活性化。

newborn rat SMCを、上記の時間、Ang II(100nM)で刺激し、各MAPK特異抗体で免疫沈降後、それぞれMBP(ERK), GST-cJun(JNK), GST-ATF2(p38)を基質としたin vitro kinase assayを施行した。A. オートラジオグラフ。矢印は各MAPKの基質の位置。B. 定量結果。無刺激時の各MAPKの活性を基準としてその倍率で表記した。4回の値の平均±標準誤差。

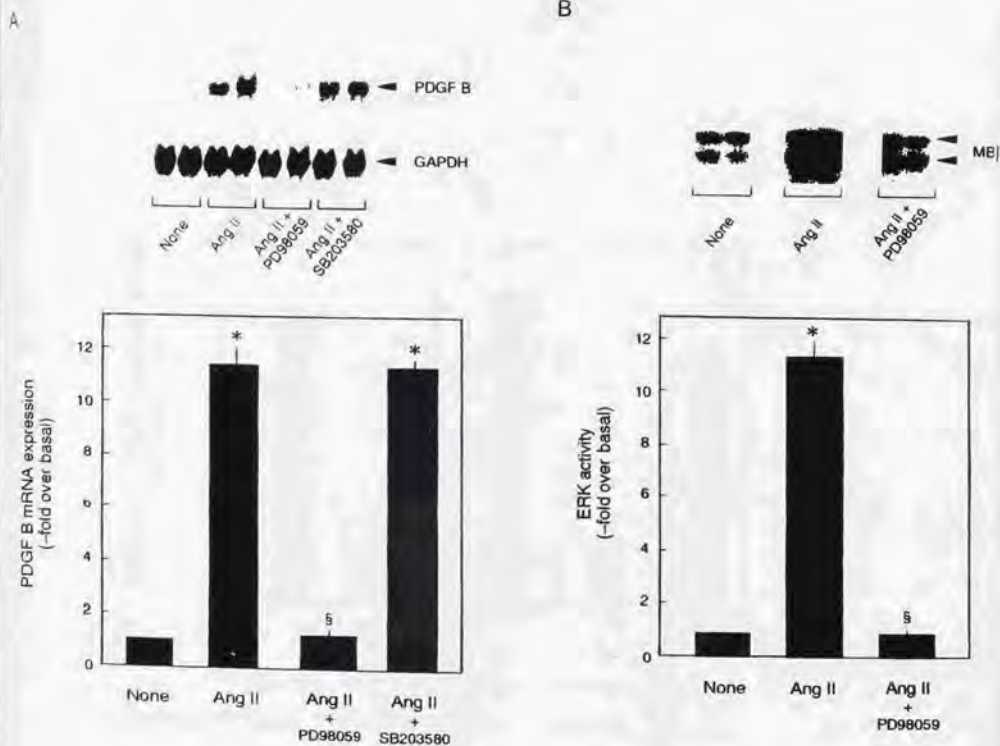


Fig. II-6. PD98059によるPDGF-B鎖mRNA遺伝子発現とERK活性化の抑制。
 A. PD98059(30mM)またはSB203580(10mM)存在、非存在下、newborn rat SMCをAng II(100nM)で刺激して、PDGF-B鎖mRNAの発現をノーザンブロットで検討した。上段はオートラジオグラフ、下段は定量結果。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激の時の値を基準としてその倍率で表記した。B. PD-98059(30mM)存在、非存在下、newborn rat SMCをAng II(100nM)で刺激して、ERK抗体で免疫沈降後、MBPを基質としたin vitro kinase assayを施行した。上段はオートラジオグラフ、下段は定量結果。無刺激時のERKの活性を基準として、その倍率で表記した。*と§は各々、“無刺激”と“Ang II刺激”値と比べ有意差($p < 0.05$)があることを示す。

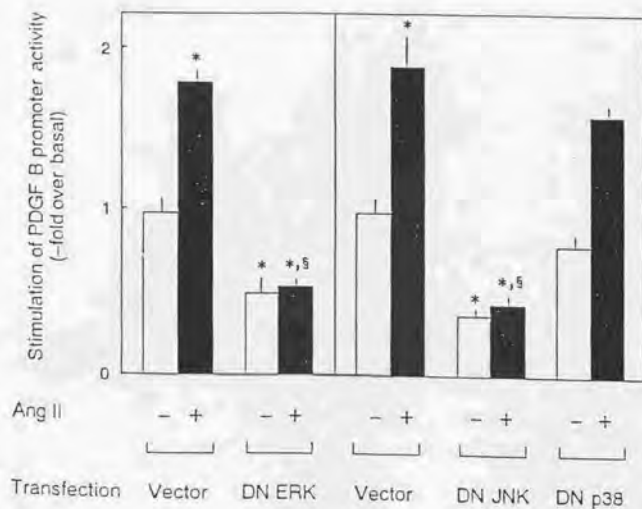
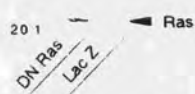
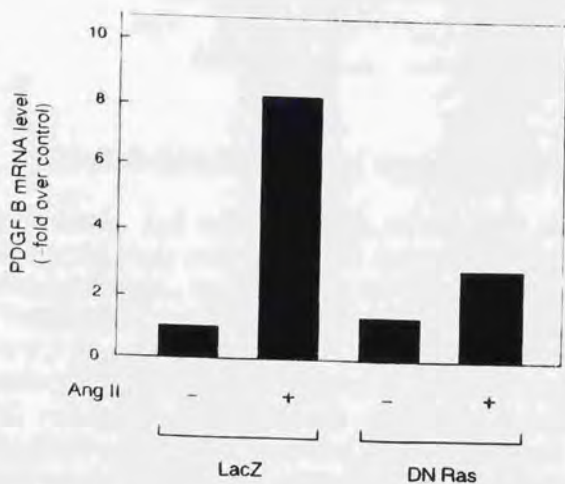
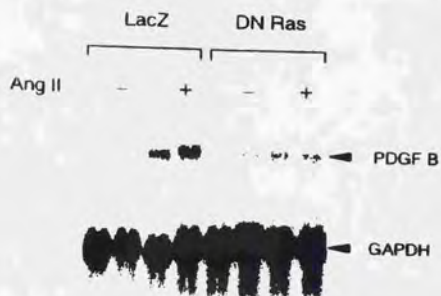


Fig. II-7. 優性抑制型MAPK発現ベクターによるPDGF-Bプロモーター活性の抑制。
 newborn rat SMCにSis-Lucと各優性抑制型MAPK発現ベクターまたは空ベクターを
 コ・トランスフェクトした。72時間後にAng II(100nM)で4時間刺激し、ルシフェラー
 ゼ活性を測定した。優性抑制型ERKおよびJNKでルシフェラーゼ活性は抑制された。4回
 の値の平均±標準誤差で表記。*と§は各々、"Vector群無刺激"と"Vector群Ang II刺
 激"値と比べ有意差($p<0.05$)があることを示す。

A



B



C

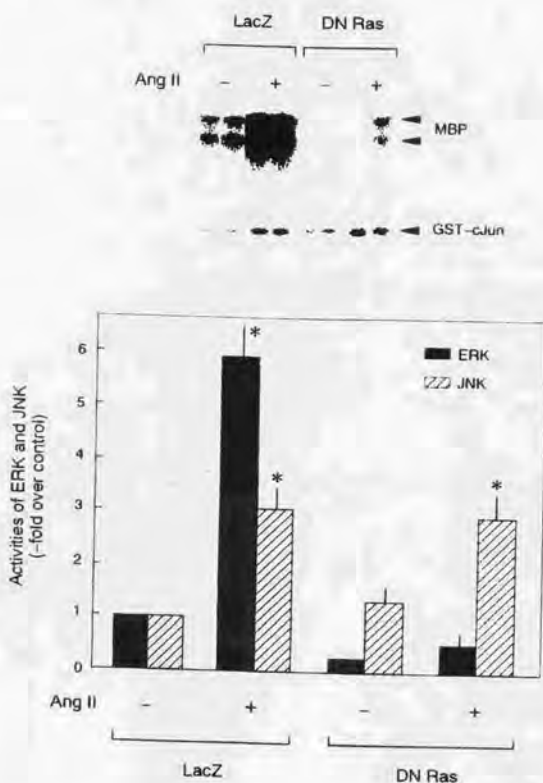
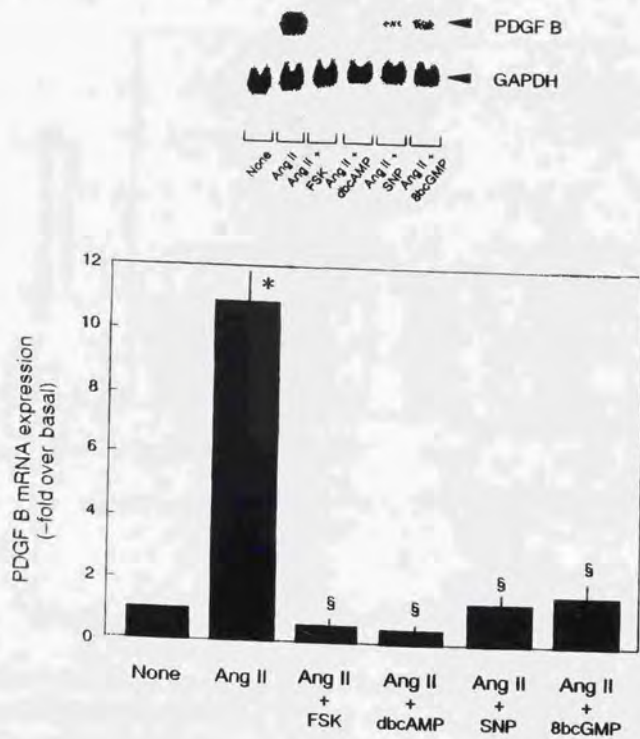


Fig. II-8. 優性抑制型Ras(DN Ras)の発現によるPDGF-B鎖mRNA発現とERK活性の抑制。

newborn rat SMCに、Asn17-Ras(DN Ras)をコードするアデノウイルスとコントロールウイルスとしてLacZをコードするアデノウイルスを感染させた。

A. 細胞溶解物を泳動分離し、Rasの発現をウエスタンブロットで検討した。 B. Ang II(100nM)で4時間刺激し、PDGF-B鎖mRNAの発現をノーザンブロットで検討した。オートラジオグラフ(上)とその定量結果(下)。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激の時の値を基準としてその倍率で表記した。C. Ang II(100nM)で、7分(ERK)または15分(JNK)刺激し各特異抗体で免疫沈降後in vitro kinase assayを施行した。オートラジオグラフ(上)とその定量結果(下)。LacZ群無刺激時の各MAPKの活性を基準としてその倍率で表記した。3回の値の平均±標準誤差で表記した。*は"LacZ群刺激なし"と有意差($P<0.05$)があることを示す。

A



B

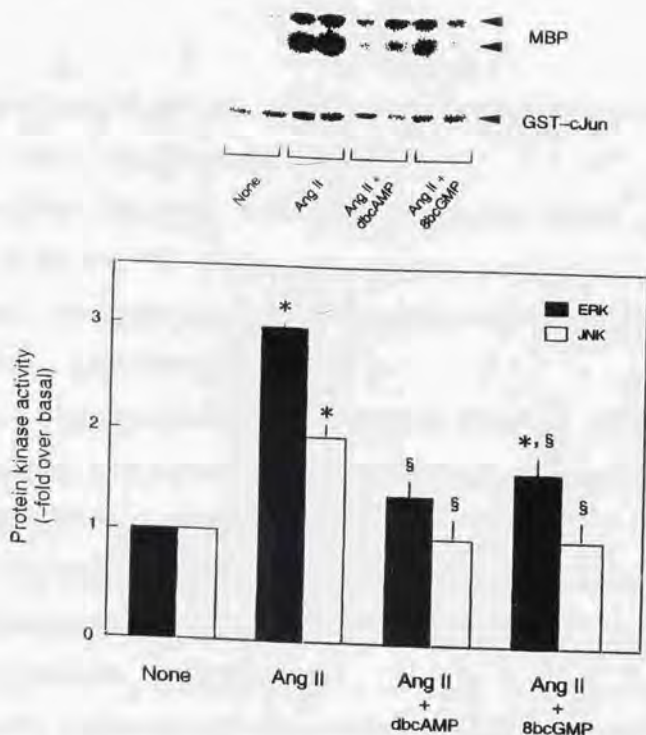


Fig. II-9. サイクリックヌクレオチドによるPDGF-B鎖mRNA発現とERK,JNK活性の抑制。

newborn rat SMCをAng II(100nM)で各々、4時間(PDGF-B鎖mRNA発現)、7分(ERK活性)、15分(JNK活性)刺激した。サイクリックヌクレオチド誘導体(dbcAMP, 8bcGMP; 0.3mM)、およびFSK(10 μ M)、SNP(100 μ M)は、刺激15分前に添加した。A. PDGF-B鎖mRNA発現をノーザンプロットにより検討した。オートラジオグラフ(上)とその定量結果(下)。各PDGF-B鎖mRNAのバンドを、相当するGAPDHmRNAで補正し、無刺激の時の値を基準としてその倍率で表記した。B. 各MAPK抗体で免疫沈降後、MBP(ERK)およびGST-cJun(JNK)を基質としたin vitro kinase assayを施行した。オートラジオグラフ(上)とその定量結果(下)。3回の値の平均 \pm 標準誤差で表記した。無刺激時の各MAPKの活性を基準として、その倍率で表記した。*と§は各々、“刺激なし”、“Ang II刺激”と有意差($P < 0.05$)があることを示す。

文献

1. Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1994;330:981-993
2. Schwartz SM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 1995; 77: 445-465.
3. Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular remodeling and the restenosis problem. *Circulation.* 1994;89:2888-2891
4. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 1992;89:507-511.
5. Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D. Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest.* 1993;91:1822-1829
6. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 1992; 11: 4251-4259.
7. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71: 1207-1210.
8. Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, Hart CE, Wilcox JN, Schwartz SM. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol.* 1990; 111: 2149-2158.
9. Lindner V, Giachelli CM, Shaerts SM, Reidy MA. A subpopulation of smooth muscle cells in rat arteries expression PDGF-B chain mRNA. *Circ Res.* 1995;

10. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991; 253: 1129-1132.
11. Abe J, Deguchi J, Matsumoto T, Takuwa N, Noda M, Ohno M, Makuuchi M, Kurokawa K, Takuwa Y. Stimulated activation of platelet-derived growth factor receptor in vivo in balloon-injured arteries: a link between angiotensin II and intimal thickening. *Circulation*. 1997; 96: 1906-1913.
12. Powell JS, Closel JP, Muller RKM, Kuhan H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*. 1989; 245: 186-188.
13. Prescott MF, Webb RL, Reidy MA. Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT1 receptor antagonist: effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol*. 1991; 139: 1219-1296.
14. Stouffer AG, Owens GK. Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor- β . *Circ Res*. 1992; 70: 820-828.
15. Gibbons G, Pratt R, Dzau V. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine TGF- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1992; 90: 456-461.
16. Weber H, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin*

Invest. 1994; 93: 788-798.

17. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1419-1424.
18. Berk BC, Rao GN. Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *J Cell Physiol.* 1993; 154: 368-380.
19. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulates vascular smooth muscle cell growth responses to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2268-2274.
20. Duan DS, Pazin MJ, Fretto LJ, Williams LT. A functional soluble extracellular region of the platelet-derived growth factor (PDGF) β -receptor antagonizes PDGF-stimulated responses. *J Biol Chem.* 1992; 266: 416-418.
21. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991; 108: 193-200.
22. Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakai T, Sugano S, Saito I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucl Acids Res.* 1995; 23: 3816-3821.
23. Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Saito Y, Takamori K, Tokuda C, Saito I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 1320-1324.
24. Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dichek DA. In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity.

Circulation 1995;91:2407-2414.

25. Kanegae Y, Makimura S, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol.* 1994;47:157-166.
26. Noda M, Katoh T, Takuwa N, Kumada M, Kurokawa K, Takuwa Y. Synergistic stimulation of para-thyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17911-17917.
27. Gordon D, Mohai LG, Schwartz SM. Induction of polyploidy in cultures of neonatal rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 1989; 59: 633-644.
28. Majesky MW, Benditt EP, Schwartz SM. Expression and developmental control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/sis genes in rat aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 85: 1524-1528.
29. Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Tsai RC, Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohkubo A, Takaku F. cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in atherosclerosis. *J Biol Chem.* 1991;266: 3768-3773.
30. Lemire J, Covin CW, White SW, Giachelli CM, Schwartz SM. Characterization of cloned aortic smooth muscle cells from young rats. *Am J Pathol.* 1994; 144:1068-1081.
31. Majesky MW, Giachelli CM, Reidy MA, Schwartz SM. Rat carotid neointima smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of artery injury. *Circ Res.* 1992; 71: 759-768.
32. Abe J, Zhou W, Taguchi J, Takuwa N, Miki K, Okazaki H, Kurokawa K, Kumada M, Takuwa Y. Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by

- antisense CDC2 and CDK2 oligonucleotides in rat carotid artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198:16-24.
33. Hamada K, Takuwa N, Zhou W, Kumada M, Takuwa Y. Protein kinase C inhibits the CAK-CDK2 cyclin-dependent kinase cascade and G1/S cell cycle progression in human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Acta.* 1996;1310:149-156.
 34. Takuwa N, Takuwa Y. Ras activity late in G1 phase required for p27^{Kip1} downregulation, passage through the restriction point and enter into S phase in growth factor-stimulated NIH3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5348-5358.
 35. Taguchi J, Abe J, Okazaki H, Ochiai M, Ohno M, Takuwa Y, Kurokawa K. Angiotensin converting enzyme inhibitors on Dup 753 prevent neointimal formation following balloon injury with single topical or multiple systemic application. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;196:969-974.
 36. Gotwals PJ, Chi-Rosso G, Lindner V, Yang J, King L, Fawell SE, Koteliensky E. The alpha 1 beta 1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *J Clin Invest.* 1996;97:2469-2477.
 37. Mitsui H, Maruyama T, Kimura S, Takuwa Y. Thrombin activities two stress-activated protein kinase, c Jun-N terminal kinase and p38, in HepG2 cells. *Hepatology.* 1998; 27: 1362-1367.
 38. Bonthron DT, Sultan P, Collins T. Structure of the murine c-sis protooncogene (Sis, PDGF B) encoding the B chain of platelet-derived growth factor. *Genomics.* 1991; 10: 287-292.
 39. Mitsui H, Takuwa N, Kurokawa K, Exton JH, Takuwa Y. Dependence of

- activated G α 12-induced G1 to S cell cycle progression on both Ras/mitogen-activated protein kinase and Ras /Rac 1/Jun N-terminal kinase cascades in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1997; 272: 4904-4910.
40. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature.* 1997; 386: 296-299.
 41. Barr E, Leiden JM. Somatic gene therapy for cardiovascular disease. Recent advances. *Trend Cardiovascu Med.* 1994;4:57-63.
 42. Guzman RJ, Lemarchand P, Crystal G, Epstein SE, Finkel T. Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima. *Circulation.* 1993;88:2838-2848.
 43. Nakaoka T, Gonda K, Ogita T, Otawara-Hamamoto Y, Okabe F, Kira Y, Harii K, Takuwa Y, Fujita T. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2824-2832.
 44. Huang S, Endo RI, Nemerow GR. Upregulation of integrins alpha v and beta 3 and alpha v and beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J. Virol.* 1995; 69: 2257-2263
 45. Sirois MG, Simons M, Edelman ER. Antisense oligonucleotides inhibition of PDGF- β receptor subunit expression direct suppression of intimal thickening. *Circulation.* 1997; 95: 669-676.
 46. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 3739-3746.

47. Sarembock IJ, GertsSD, Gimple LW, Owen RM, Powers ER. effectiveness of recombinant desulphatothirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation*. 1991;84:232-243.
48. Rade JJ, Schulick AH, Virmani R, Dichek DA. Local adenoviral-mediated expression of recombinant hirudin reduces neointima formation after arterial injury. *Nature Med*. 1996;2:293-298.
49. Abe J, Deguchi J, Takuwa Y. Tyrosine phosphorylation of platelet derived growth factor β receptors in coronary artery lesions : implications for vascular remodeling after directional coronary atherectomy and unstable angina pectoris. *Heart*. 1998;79:400-406.
50. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362: 801-809.
51. Aberg G, Ferrer P. Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990; 15(Suppl. 5): S65-S72.
52. Rakugi H, Jacob HJ, Krieger JE, Ingelfinger JR, Pratt RE. Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. *Circulation*. 1993; 87: 283-287.
53. Rakugi H, Kim D, Krieger JE, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. *J Clin Invest*. 1994; 93: 339-344.
54. Viswanathan M, Strimberg C, Seltzer A, Saavedra JM. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in the neointima of rat aorta. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1707-1712.
55. Schmitz U, Ishida T, Ishida M, Surapisitcha J, Hasham MI, Pelech S, Berk BC.

- Angiotensin II stimulate p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. Role in activation of JNK. *Circ Res.* 1998; 82: 1272-1278.
56. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9: 726-735.
 57. Khachigian LM, Fries JW, Benz MW, Bonthron DT, Collins T. Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 22647-22656.
 58. Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T. Egr-1 induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science.* 1996; 271: 1427-1431.
 59. Sadoshima J, Izumo S. The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21^{ras} via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.* 1996; 15: 775-787.
 60. Schieffer B, Paxton WG, Chai Q, Marrero MB, Bernstein K. Angiotensin II controls p21^{ras} activity via pp60c-src. *J Biol Chem.* 1996; 271: 10329-10333.
 61. Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya M, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 14169-14175.
 62. Reidy MA, Clowes AW, Schwartz SM. Endothelial regeneration. V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab Invest.* 1983; 49: 569-575.
 63. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.*

1993; 329: 2002-2012.

64. Drexler H. Endothelial dysfunction; clinical implications. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1997; 34: 287-324
65. Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*. 1993; 262: 988-990.
66. Daniel TO, Gibbs VC, Milfay DF, Williams LT. Agents that increase cAMP accumulation block endothelial c-sis induction by thrombin and transforming growth factor- β . *J Biol Chem*. 1987; 262: 11893-11896.

