

アンジオテンシンⅡの血管平滑筋細胞肥大作用に おける c-myc の関与について

鴨井 公 司 堀内 正 嗣 浜 純 吉
竹中 俊 彦 木野 博 文 杉村 圭 一
島田 誠二郎 甲斐 達 也 永田 就 三
近藤 宏 和 山本 義 浩 香取 瞭

近畿大学医学部第1内科学教室

Role of c-myc in vascular smooth muscle cell hypertrophy under angiotensin II stimulation

Kouji Kamoi, Masatsugu Horiuchi, Junkichi Hama,
Toshihiko Takenaka, Hirofumi Kino, Keiichi Sugimura,
Seijiro Shimada, Tatsuya Kai, Shuzo Nagata,
Hirokazu Kondo, Yoshihiro Yamamoto and Ryo Katori

Fist Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

Using antisense oligodeoxynucleotides (ODNs), we investigated whether c-myc protein production by angiotensin II (A-II) was involved in hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMCs). We designed antisense ODNs specific for c-myc mRNA. The cultured VSMCs were isolated from Sprague-Dawley rats (male 7-8 weeks) by the explant method. The cells were stimulated by 10^{-5} M A-II with or without antisense ODNs or sense ODNs. The growth response to A-II was assessed by the uptake of [3 H]thymidine (Td) or [3 H]leucine. A-II increased [3 H]Td uptake into VSMCs while antisense ODNs for c-myc mRNA specifically inhibited uptake, in a concentration-dependent manner. More than 5 pM antisense ODNs showed significant effects on the inhibition and the maximal inhibitory effect was 75% in 500 pM concentration. However, sense ODNs did not demonstrate the same results. Similarly, c-myc antisense ODNs decreased [3 H]leucine uptake into VSMCs by A-II stimulation. Our results suggest that the c-myc gene product in VSMCs by A-II is involved in the hypertrophic effects induced by A-II.

Key words : angiotensin II, vascular smooth muscle cell, c-myc, antisense oligodeoxynucleotides

緒 言

近年、高血圧の大きな合併症である動脈硬化の成因である血管の再構築に血管壁内での組織レニン-アンジオテンシン系の関与が示唆されている¹が、その発生機序は不明である。血管の再構築の第1段階として血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖肥大や遊走が起こり^{2,3}、これにアンジオテンシンII(A-II)が関与し、その細胞内情報伝達にプロトオンコジーンであるc-myc^{4,5}、c-fos^{5,6,7,8}、c-myb⁹遺伝子などの関与が推察されている。A-IIが受容体に結合すると、c-myc遺伝子はimmediate early geneとして早期に発現することが知られている^{4,5}が、それ以降c-mycがどのようにして細胞に働くかは不明である。本研究では、培養VSMCを用いてA-IIの細胞肥大作用に、c-myc mRNAの発現が必須であることをc-mycに特異的なアンチセンスデオキシオリゴヌクレオチド(ODN)を使って³H]thymidine及³H]leucineの取り込みを指標に検討した。

方 法

VSMCは、7~8週齢の雄性Sprague-Dawleyラット胸部大動脈よりRussell RossのExplant法¹⁰に準じて分離培養した。10% fetal bovine serum (FBS)を含んだDulbecco's modified Minimum Essential Medi-

um (DMEM)で培養し、継代維持した。4~7代の細胞を $5\sim 10 \times 10^4$ cells/mlの濃度に調整し、細胞がsub-confluentの状態になった時点で培養液を0.5% FBSを含んだDMEMに交換した。48時間培養した後、培養液を 10^{-5} M A-II (Sigma, Missouri, USA)を含むDMEMに交換し、各濃度のアンチセンスODNまたはセンスODNを添加し、21時間培養後、0.1 μ Ci thymidine [methl-³H] (NET-027, DuPont/NEN Research Products, Boston, USA)あるいはleucine [4,5-³H(N)] (NET-135, DuPont/NEN Research Products, Boston, USA)を添加し3時間培養後、液体シンチレーションカウンターで³H]thymidineおよび³H]leucineの取り込みをカウントした。

また、c-mycアンチセンスODN、センスODNは、Figure 1に示す通りc-myc遺伝子配列の第2エクソンの始まり部分の15塩基配列を基にそれと相補的な配列をアンチセンスODN、それと同じ配列をセンスODNと設定した。

結 果

1. ³H]thymidineの取り込み (Fig. 2a)

アンチセンスODN各濃度添加群ではA-II刺激による³H]thymidineの取り込み増加は添加したアンチセンスODNの濃度に依存して抑制した。アンチセンスODNは5 pMから

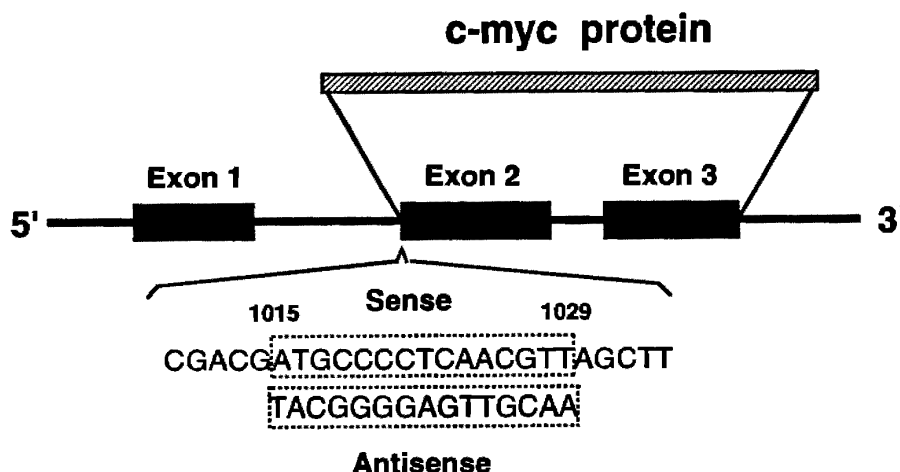


Fig. 1 The antisense targeted to c-myc and sequence of ODNs
The specific antisense ODNs were designed from rat c-myc gene (1015-1029) in the initial sequence of the second exon.

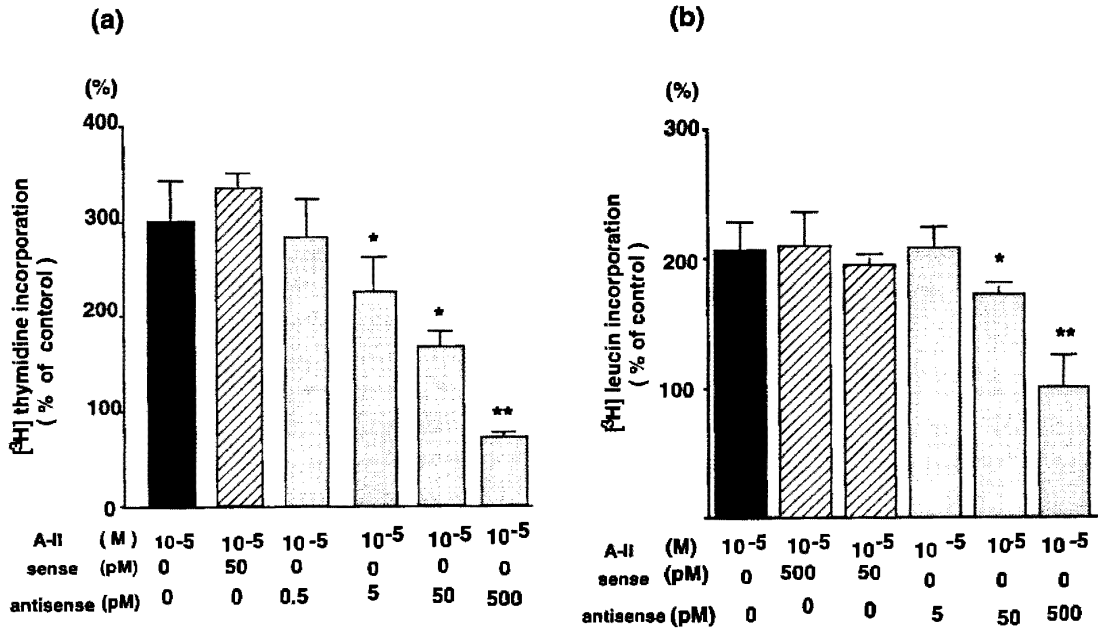


Fig. 2 The effects of antisense ODNs on DNA and protein synthesis
 (a) Ang II increased the uptake of [³H] thymidine into VSMCs and antisense ODNs for c-myc mRNA inhibited the uptake in a specific concentration-dependent manner. More than 5 pM of antisense ODNs resulted in significant inhibition, with a maximal inhibitory effect of 75% at a 500 pM concentration. However, sense ODNs did not have any effect.
 (b) Ang. II increased the uptake of [³H] leucine into VSMCs. Similarly, c-myc antisense ODNs reduced uptake in a dose-dependent manner above 50 pM of ODNs. Taken together, the c-myc antisense ODNs inhibited the hypertrophic effect of Ang. II on VSMCs.
 each value is the mean±SD, n=6.
 *;p<0.05,**; p<0.01, Statical analysis was performed by Student's t-test.

効果があり、最大で 500 pM で無刺激のコントロール群の約75%のレベルまで抑制した。センス ODN 添加群ではその効果はなかった。

2. [³H]leucine の取り込み (Fig. 2b)

[³H]thymidine の取り込み 同様に、センス ODN の各濃度添加では、[³H]leucine の取り込みは A-II 刺激のみの群と変わらないが、アンチセンス ODN 各濃度添加群では A-II 刺激による [³H]leucine の取り込み増加は添加したアンチセンス ODN の濃度に依存して抑制した。アンチセンス ODN は 50 pM から効果があり、最大で 500 pM ではほぼ無刺激のコントロール群と同程度のレベルまで抑制できた。

考 察

今回の我々の実験で、A-II の VSMC での肥大作用において c-myc がより重要な役割を

していることをアンチセンスオリゴヌクレオチド法で証明できた。アンチセンスオリゴヌクレオチド法とは遺伝子の相補性を利用して、特定の遺伝子配列を選択的に制御する方法であり、そのメカニズムとして 1) 転写段階での阻害、2) RNA のスプライシングの阻害、3) RNA の分解促進、4) RNA の核膜通過阻害、5) 翻訳段階での阻害、が考えられている¹¹が、どれがその中心のメカニズムなのかは、定かではない。今回用いた c-myc のアンチセンス ODN の配列は実際の c-myc の構造蛋白のアミノ酸配列をコードしている第2エクソンの開始コドンを含めたオリゴレオチドを用いた。この標的とする部位によってアンチセンス ODN の特異度が異なると言われている¹¹。本実験の場合、ODN が 10⁻¹² M の単位のレベルで効果が認められたことより、ODN の効果が設定した塩基

配列に特異的で、その選択において効果的な部位であったと考えられた。

VSMC の肥大には *c-myc* 以外にも *c-fos*^{5, 8, 9, 10}, *c-myb*¹¹ などのプロトオンコジーンや PDGF^{4, 12}, bFGF¹³, TGF β ¹⁴ などの成長因子や *cdc2*, *cdk2* などの細胞周期調節遺伝子が密接に関わり合い肥大増殖を調節している事が報告されている。しかし、最近では、*c-myc* は種々の細胞で成長因子の刺激によって発現し細胞増殖の調節に最も重要な役割を担っていることが報告されており^{15, 16}、その重用性が注目されている。今回の我々の実験結果でも、DNA 合成と蛋白合成の両面から、*c-myc* アンチセンス ODN が VSMC の増殖を著明に抑制したことから、*c-myc* の重要性が証明できたと考えられた。

文 献

- Victor J D, Gray H G, Richard E P. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* 1991; 18 (suppl II): II-100-11-105.
- Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanism underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 1990; 70: 1177-1209.
- Russell R. The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
- Allen J N, Richard E P, Victor J D. 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.
- Mark S K, Gail E S. Regulation of oncogene expression in cultured aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 12865-12868.
- Yasuhiro K, Michitoshi S, Terutaka T, et al. Angiotensin II induces expression of *c-fos*-gene through protein kinase c activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 150: 52-59.
- Mark B T, Bradford C B, Terutaka T, et al. Angiotensin II induces *c-fos* mRNA in aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 1989; 264: 526-530.
- Allen J N, Richard E P, Carol S E, et al. Angiotensin II induces *c-fos* expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 1989; 13: 706-711.
- Michael S, Robert D R. Antisense nonmuscle myosin heavy chain and *c-myb* oligonucleotides suppress smooth muscle cell proliferation in vitro. *Circ Res* 1992; 70: 835-843.
- Russell R. The smooth muscle cell II-growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971; 50: 172-186.
- Claude H, Jean-Jacques T. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 99-125.
- Josiah N W, Kathleen M S, Lewis T W, et al. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1988; 82: 1134-1143.
- Hiroshi I, Masashi M, Richard E P, et al. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91: 2268-2274.
- Linda V G, Richard A M. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor- β receptor phenotypes as a function of cell density in culture. *J Biol Chem* 1989; 264: 5241-5244.
- Greenberg M E, L. A. Greene, E. B. Ziff. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 14101-14110.
- Muller R, R Brovo, J Burckhardt, T Curran. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* 1984; 312: 716-720.