



血管平滑筋細胞における成長ホルモン投与による遺伝子発現の変化 : differential display 法を用いた検討

吉岡, 嗣朗
千原, 和夫

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 63(3/4):1-8

(Issue Date)

2003-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317269>



血管平滑筋細胞における成長ホルモン投与による遺伝子発現の変化 —differential display 法を用いた検討

吉岡 嗣朗, 千原 和夫

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学 (旧内科学Ⅲ)
住所: 650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1
電話: 078-382-5885
FAX: 078-382-5899

(平成14年12月17日受付)

要 約

最近, 成長ホルモン (GH) が動脈硬化に影響を及ぼすことが報告されているが, そのメカニズムについてはよく知られていない。動脈硬化において血管平滑筋が重要な役割を果たすことはよく知られているため, 我々は血管平滑筋細胞に成長ホルモンを加え, それにより変化する遺伝子群をdifferential display法を用いて検討した。その結果, cytochrome oxidase subunit II/IIIやprystanoyl Co-A oxidaseなどのmRNAがGH投与により増加し, ADAMST-1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeat) などのmRNAが減少していることが観察された。ミトコンドリア遺伝子の転写, 複製を制御しているのはmitochondrial transcription factor 1 (mtTF1) という転写因子であり, cytochrome oxidase subunit II/IIIのmRNAが増加することから, 我々はGHが直接mt TF1の遺伝子レベルを制御しているのではないかと考え, 定量PCRを使いその発現量を測定したところ, GH投与によりmtTF1のmRNAが用量依存性に増加し, JAK2阻害剤であるAG490投与によりコントロールレベルまで抑制されることが明らかとなった。このことより, 血管平滑筋において成長ホルモンは, JAK2シグナリングを介してmt TF1を変化させ, ミトコンドリア遺伝子の転写, 複製を制御している可能性が示された。

緒 言

近年, GHが動脈硬化の進展において重要な役割を果たしていることが報告されている。先端巨大症の患

者は動脈硬化のリスクが高く⁽¹⁾, オクトレオチドの投与によりGHやIGF-Iの値が正常化すると, そのリスクが低下する。しかし, GHがどのように動脈硬化に関与しているのかは未だ明らかではない。動脈硬化の進展において血管平滑筋は重要な役割を担っている。血管平滑筋細胞は本来血管の中膜に存在するが, 動脈硬化では様々な刺激を受けてその形態を収縮型から合成型に変化させ, 内膜に遊走し, そこで増殖し, 様々なタンパク質を分泌する⁽²⁾。すでにGHが血管平滑筋の増殖を制御しているかもしれないという報告があるが, GHが血管平滑筋にどのように作用するかについては説明されていない^(3, 4)。そこで我々はdifferential display法を用いて, 血管平滑筋においてGHがどの遺伝子の発現を制御しているのかを調べ, さらに蛍光プローブを用いた定量PCR法にて, その変化を定量した。

方 法

細胞培養

血管平滑筋細胞は3週齢の雌のSprague-Dawleyラットの胸部大動脈から, 酵素法にて分離した。直径100 mmのコラーゲンコートしたディッシュを使用し, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に10%の牛血清, 100mg/Lペニシリン-G, 15.5mg/Lカナマイシンを添加した培養液中で, この血管平滑筋細胞を37C, 5% CO₂条件下で培養した。トリプシン/EDTAを使用して1:5の比率で継代培養を行った。実験には継代7-9代目の細胞を使用した。ラットL6細胞 (GH受容体が存在しない骨格筋の筋芽細胞) と, ラットのH4-11-E細胞 (GH受容体陽性の肝癌細胞) もまた血管平滑筋細胞と同様の培養液で培養した。

キーワード: 血管平滑筋, 成長ホルモン, ミトコンドリア, ディファレンシャル, ディスプレイ法

RNA抽出とdifferential display法

70%コンフレント状態にて培養液を0.1%のウシ血清アルブミン (BSA) を含んだ血清無添加のDMEMに交換した。6時間後、処置群ではrhGHを100ng/mlの終濃度となるよう培養液に加え、コントロール群では0.1%BSAを含んだphosphate buffered saline (PBS) を同量加えた。JAK2の関与を検討する実験では、JAK2のインヒビターであるAG490 (10nM, Wako Pure Chemical Industries) をGH投与30分前に培養液に加えた。GH投与6時間後トータルRNAを、トリゾール (GIBCO BRL) をもちいてそれぞれの群より抽出した。DNAのコンタミネーションを防ぐため、DNase I (Sigma) にて処理を行なった。cDNAは250 ngのトータルRNAより50mM Tris-HCl (PH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 15u/μl MLV reverse transcriptase (GIBCO BRL), 2U/μl RNase inhibitor (Promega), 10mM DTT, 20μM dNTPs, 2μM anchor primers (14mer T12M (A, T, G, C) (M=ATGCの混合物) を使用して合成した。作成したcDNAはPeng Liangらの報告した方法⁽⁵⁾に基づき、differential display法に使用した。すなわち5種類のarbitrary primers (AP1~5 10mer) と4種類のanchor primer, Taq DNA polymerase (Promega), 400nM dNTPs mix そして10nM [³²P]dCTPを用いて逆転写反応にて作成されたcDNAをテンプレートとして各々のグループで合計20種類のPCRを行った。PCR条件は、94C 3分, 40C 5分 72C 5分を1サイクル行った後、94C 30秒, 40C 2分, 72C 30秒を35回繰り返す、最後に72C 5分という条件で行った。コントロール群とrhGH投与群のcDNA産物は、6%ポリアクリルアミド尿素ゲル上で2000Vで2時間泳動した。ゲルを乾燥した後、Kodak X-OMAT ARフィルム上で2日間暴露した。コントロール群とrhGH投与群間でそれぞれ増加したcDNAバンド、及び減少したcDNAバンドを抽出し、再度同じセットのプライマーを使用してPCRを行った。PCR条件は、94C 30秒, 40C 2分, 72C 30秒を38回繰り返したのち、72Cを5分の条件で行った。PCR産物を2%アガロースゲル上で泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。さらにそのcDNAのバンドを切り出し、QIAEX II gel extraction system (QIAGEN) を使用して抽出し、pT7 Blue ベクター (Novagen) に組み込んだ後、PRISM model 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を使用してその塩基配列を決定した。

mtTF1 RT-PCR

DNA除去処理を行ったRNAから、differential display

時に用いた方法にて cDNAを調製した。そのcDNAをmtTF1に対するプライマー、すなわち (5'-CCAAAGAAACCTATGAGTTC-3' と 5'-CGTAAATGTTATATGCTGACCGAGG-3'), 10mM Tris-HCl (PH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 20μM dNTPsを含む緩衝液中でTaqDNA polymerase を使用して、94C 45秒, 54C 45秒, 72C 1分 30サイクルのPCRにて増幅した。PCR産物は2%アガロースゲル上で泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

定量PCR

mt TF1 mRNAの正確な定量を行うため、ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) を使用して定量PCRを行った。Taqmanプローブ、センスプライマー、アンチセンスプライマーは次のように設計した。

Taqmanプローブ: 5'-FAM-TGCATTTCTGTTGACCTTT
TGAGCC-TAMURA-3'

センスプライマー: 5'-CATGGACTTCTGCCCACTGA-3'

アンチセンスプライマー: 5'-AAACGGCAGAACTCGTCAT
GAT-3'

cDNAの作成については前述の通りである。プロトコル通りにPCR master mix (Applied Biosystems) を用いて、それぞれの実験についてPCRを行った。PCR条件は、50C 2分と95C 10分を1サイクル行った後、95C 15秒, 60C 1分のサイクルを40回繰り返した。これらの反応を96穴のプレート上で3回繰り返した。PCR産物が一定の値に到達するときの回数であるスレッシュホールドサイクルを、それぞれのmRNAの量を定量化するために計算した。

ウエスタンブロット解析

サブコンフレント状態のH4細胞を、1, 10, 100ng/mlの濃度のrhGHで10分間刺激した後溶解し、STAT 5B抗体を使用し免疫沈降させた。これをPAGEで展開した後、メンブレン (Hybond-P, Amersham LIFE SCIENCE) に移行させ、STAT 5B抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および、燐酸化STAT5抗体 (Cell Signaling technology) でプロットイングを行った。

データ分析

結果は、平均値±SDで表した。ANOVAで解析後、多重比較には適時FisherのPLSD post hoc testing を使った。P値0.05以下で統計学的有意とみなした。

結 果

differential display法

数個のmRNA量がリコンビナントヒトGH (rhGH) (Eli Lilly) によって増加した。その塩基配列を決定したところ、増加したmRNAはmitochondrial cytochrome oxidase subunit II/IIIとpristanoyl-CoA oxidaseであることが判明した。一方、rhGHによって発現が減少したmRNAの一つは、ADAMST-1であることが判明した。

血管平滑筋におけるrhGHによる mitochondrial transcription factor 1 (mtTF1) mRNAレベルの変化

RT-PCRにより、血管平滑筋細胞においてrhGHがmtTF1のmRNAを増加させることが再確認された。(Fig 1A) さらに、定量PCRでは、コントロール群、

rhGH 1ng/ml, 10ng/ml, rhGH 100ng/ml投与群のスレッシュヨールドサイクルは各々31.280±0.136, 30.767±0.242, 30.675±0.394, 29.001±0.422 (n=3 平均値 ±SD) であり、rhGHがmtTF1のmRNAを用量依存性に増加させることが判明した。100ng/mlのrhGHによりmtTF1 mRNAレベルは有意に増加していた。(Fig1B)

血管平滑筋におけるIGF- I による mtTF1のmRNAレベルの変化

定量PCRでは、コントロール群と100ng/mlのIGF-I 投与群のスレッシュヨールドサイクルは各々31.222±0.068と30.647±0.073 (n=3; 平均値 ±SD) であり、100ng/mlのIGF- I は血管平滑筋においてmtTF1 mRNAのレベルをごくわずかに増加させたのみで、統計学的に有意差は認められなかった (Fig2)。



Fig1A 2% アガロースゲル上でのmtTF1 mRNAのRT-PCR産物の電気泳動。mtTF1 mRNAのレベルは100ng/mlのrhGH処置にて著明に増加した。A:DNA分子サイズマーカー B:コントロール (PBS+0.1% BSA) C:100ng/ml rhGH 343塩基に相当するサイズを矢印で示してある。:B mtTF1 mRNAの定量PCR mtTF1のmRNAのレベルは用量依存性に増加した。

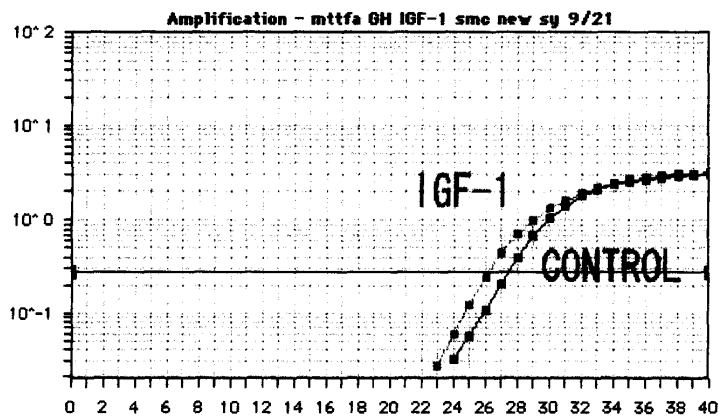
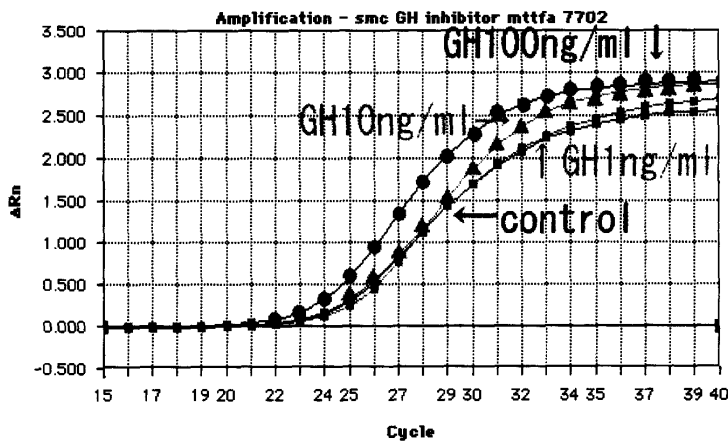


Fig.2. 血管平滑筋細胞において100ng/mlのIGF- I はmRNAのレベルを増加させなかった。

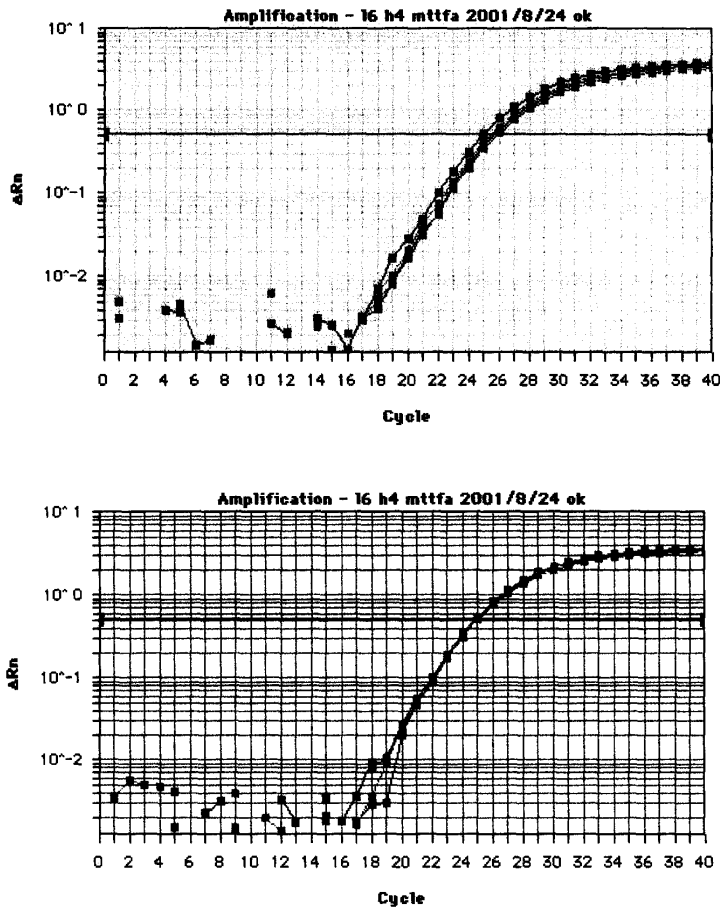


Fig. 3.A,B. 定量PCRではL6細胞(A)やH4-11-E細胞(B)においてrhGHはmtTF1 mRNAのレベルを変化させなかった。

ラットL6及びH4-11-E細胞におけるrhGHによるmtTF1 mRNAレベルの変化

rhGHのmtTF1 mRNAの発現増強効果が他の細胞においても見られる現象であるのか明らかにするため、GH受容体を持つH4-11-E細胞とGH受容体を持たないL6細胞において、同様にmtTF1 mRNAレベルの変化を調べた。定量PCRを行ったところ、L6細胞において、コントロール群、100ng/mlのrhGH、100ng/mlのIGF-I投与群のスレッシュホールドサイクルは各々 24.746 ± 0.163 , 25.666 ± 0.251 , 25.446 ± 0.217 ($n=3$; 平均値 \pm SD)で、H4-11-E細胞では、それらの値はそれぞれ 24.546 ± 0.063 , 24.572 ± 0.055 , 24.919 ± 0.080 ($n=3$; 平均値 \pm SD)であり、これらの細胞において100ng/mlのrhGH IGF-IともmtTF1 mRNAレベルを変化させないことがわかった (Fig 3)。

ウエスタンブロット解析

rhGH (1, 10, 100ng/ml) の10分間の刺激により、H4-11-E細胞ではSTAT5が用量依存性に増加した (Fig 4)。

血管平滑筋細胞におけるJAK2阻害剤AG490によるmtTF1 mRNAレベルの変化

コントロール群, rhGH 1ng/ml, rhGH 10ng/ml, rhGH 100ng/ml, 10nM AG490前処置後 100ng/ml-GH投与群のスレッシュホールドサイクルは各々 31.280 ± 0.136 , 30.767 ± 0.242 , 30.675 ± 0.394 , 29.001 ± 0.422 , 31.532 ± 0.953 ($n=3$ 平均値 \pm SD)であり、10nMの濃度のAG490による前処置にて、rhGH投与後のmtTF1 mRNAのレベルはほぼコントロールレベルまで抑えられた (Fig 5)。

考 察

今回の研究で、我々はrhGHがmitochondrial cytochrome oxidase subunit II/IIIのmRNAを増加させることを見いだした。mitochondrial cytochrome oxidaseは13のサブユニットから構成されている。I, II, IIIのサブユニットはミトコンドリアのゲノムにコードされているが、そのほかのサブユニットは核のゲノムにコードされている。I, II, IIIのサブユニットの発現は、核のゲノムにコードされている mitochondrial transcription factor 1 (mtTF1, またはmtTFAやTfamと呼ばれている) に支配されている。そのため、我々はそのmtTF1そのものの発現がrhGHによって制御されているかどうかを調べたところ、定量PCRに

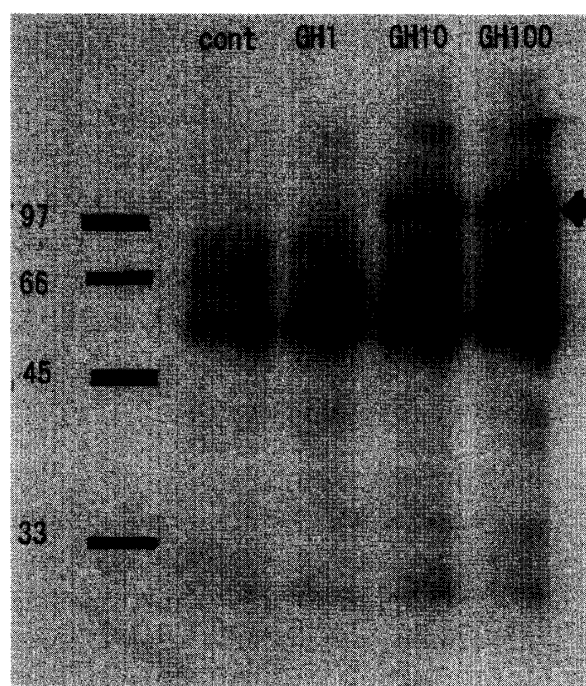
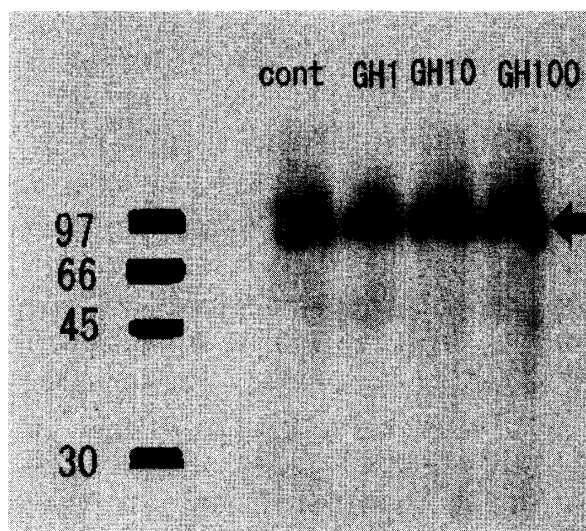


Fig.4.A,B. rhGH投与によるH4-11-E細胞におけるSTAT5の磷酸化。A.H4-11-E細胞でのコントロールあるいはrhGH 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml投与10分後のSTAT5Bの発現 B. H4-11-E細胞でのコントロールあるいはrhGH 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml投与10分後の磷酸化STAT5量

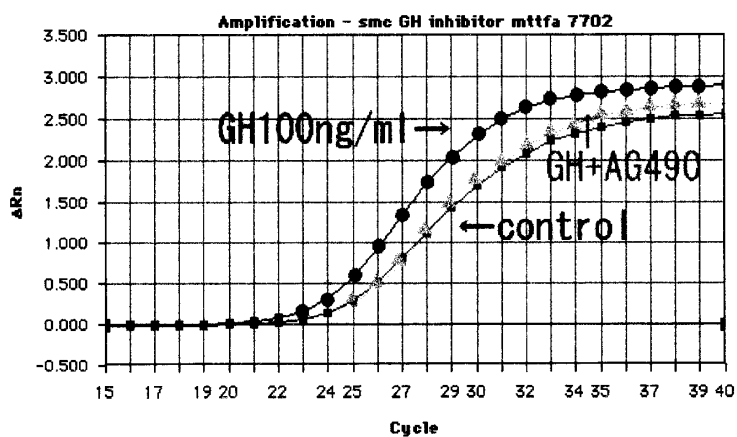


Fig.5 血管平滑筋細胞におけるAG490のmRNA量に及ぼす効果。10nM AG490の前処置により、100ng/ml rhGHによるmtTF1 mRNAの上昇は抑制された。

より、rhGHがmtTF1のmRNAレベルを容量依存性に増加させていることが判明した。血管平滑筋はGH受容体を持っており、GHはIGF-Iの合成を亢進させ、そして、そのIGF-Iがオートクライン的作用し

て細胞の増殖を促進することが知られている⁽⁶⁾。しかしながら、今回の実験ではIGF-IはmtTF1のmRNAレベルを変化させなかった。このことより、mtTF1 mRNAは、GHによって増加するものの、GHによ

て産生される IGF-Iを介する作用ではないことが考えられる。さらに、JAK2インヒビターであるAG490は、rhGHによって引き起こされるmtTF1 mRNAの発現上昇をほぼコントロールレベルまで抑制した。一方、定量PCRではrhGHはGH受容体を持たないL6細胞でmtTF1のmRNAを変化させなかった。これらの成績は、血管平滑筋において、GHはGH受容体-janus kinase (JAK2) 経路を介してmtTF1のmRNAのレベルを増加させることを示唆する。しかし、同じくGH受容体を持つH4-11-E細胞ではGHはmtTF1 mRNAのレベルを変化させなかった⁽⁷⁾。GHのシグナル伝達は主にJAK2- signal transducers and activators of transcription (STAT 5B) 系を介して行われる。このGHシグナル伝達を検討したところ、H4-11-E細胞においてもSTAT 5Bが実際に活性化されていることを確認した。血管平滑筋とH4-11-E細胞におけるGH作用の違いは、GH受容体数の違いや、GHによる細胞のシグナル伝達後の違いによるものかもしれないが、正確なメカニズムははっきりしない。

mtTF1はミトコンドリアの遺伝子発現を制御しているだけでなく、ミトコンドリアの複製も支配している⁽⁸⁾。今回の実験の結果から考えると、GHはミトコンドリアの機能や数にも影響をおよぼしている可能性がある。すなわち先端巨大症患者において動脈硬化の発症率が高いのは、GHが血管平滑筋の増殖を刺激しているからかもしれない。さらにGHは血管平滑筋細胞のみならず、心筋細胞のミトコンドリアに影響を及ぼしているかもしれない。というのは最近GHトランスジェニックマウスにおいて、心筋のミトコンドリアのクリステが変化しているという報告されたからである⁽⁹⁾。

一方、GHは循環器系に好ましい影響を与える可能性もある。拡張型心筋症や虚血性心疾患の患者において、GHの投与により、心機能や臨床症状が著明に改善したという報告がある⁽¹⁰⁾。GHが心機能を改善させるメカニズムは未だ明らかでないが、生理的な状態では動物細胞のミトコンドリアは酸化的リン酸化と呼ばれる化学反応により、ATPを作り出してほとんどのエネルギーを産生し、細胞機能を保っていることから考えると、成長ホルモンにより誘導されたmtTF1が、ミトコンドリアに作用しATP産生を高め、心機能の改善に関与しているのかもしれない。

我々はまた、血管平滑筋においてGHによりpristanoyl Co-A oxidaseのmRNAレベルも増加することを見いだした。以前の研究では、肝細胞においてマイクロアレイを用いて成長ホルモンがCo-A oxidaseを上昇させることが報告されている⁽¹¹⁾。GHはミトコ

ンドリアに影響を与えることにより、脂質代謝に関与しているかもしれない。一方、炎症反応の時などに上昇することによって知られているADAMST-1のmRNAは成長ホルモンにより減少することがわかった。しかし、成長ホルモンがADAMST-1の発現を抑制する生理学的な意義については明らかでない。

結論として、血管平滑筋細胞において、成長ホルモンはmtTF1 mRNA量を上昇させ、その結果として、mitochondrial cytochrome oxidase subunit II/III mRNA量を増加させる。しかし、GHの作用のメカニズムをさらに明らかにし、いかに臨床応用するかということについては、さらなる基礎的、臨床的研究が必要であろう。

謝 辞

技術的な面において緒方千夏氏に大変お世話になりました。血管平滑筋については上山知巳先生と高橋知三郎先生（神戸大学大学院医学系研究科）から提供していただきました。この研究の一部は文部科学省科学研究費補助金及び、成長科学協会と上原財団からの援助により行うことができました。

文 献

1. Bengtsson BA, Eden S, Ernest I, Oden A, Sjogren B 1988 Epidemiology and long-term survival in acromegaly. A study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1985. *Acta Med Scand* 223:327-35.
2. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM 1983 Kinetics of cellular proliferation arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 49:327-33
3. Boger RH 1999 Nitric oxide and the mediation of the hemodynamic effects of growth hormone in humans. *J Endocrinol Invest* 22 (5 Suppl):75-81
4. Thogersen VB, Heickendorff L, Ledet T 1996 Effect of insulin and growth hormone on the synthesis of radiolabelled proteoglycans from cultured human arterial smooth-muscle cells. *Eur J Endocrinol* 134:326-30
5. Liang P, Pardee AB 1992 Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*

257:967-71

6. Grant MB, Wargovich TJ, Ellis EA, Caballero S, Mansour M, Pepine CJ 1994 Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis? *Circulation* 89:1511-7
7. Ji S, Guan R, Frank SJ, Messina JL 1999 Insulin inhibits growth hormone signaling via the growth hormone receptor/JAK2/STAT5B pathway. *J Biol Chem* 274:13434-42
8. Fisher RP, Clayton DA 1988 Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8: 3496-509
9. Bollano E, Omerovic E, Bohlooly-y M, Kujacic V, Madhu B, Tornell J, Isaksson O, Soussi B, Schulze W, Fu ML, Matejka G, Waagstein F, Isgaard J 2000 Impairment of cardiac function and bioenergetics in adult transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene. *Endocrinology* 141:2229-35
10. Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B, Sacca L 1996 A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 334:809-14
11. Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stahlberg N, Malek RL, Lee N, Norstedt G 2001 Gene expression profile of the aging process in rat liver: normalizing effects of growth hormone replacement. *Mol Endocrinol* 15:308-18

Changes in Gene Expression by Growth Hormone in Vascular Smooth Muscle Cells(VSMC)-An Analysis with Differential Display Method

SHIRO YOSHIOKA, KAZUO CHIHARA

Division of Endocrinology/Metabolism, Neurology, and Hematology/ Oncology,

Department of Clinical Molecular Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

All Correspondence to: Dr. Yasuhiko Okimura E-mail address:okimura@ams.kobe-u.ac.jp

Abstract

It is well known that growth hormone (GH) is involved in the development of arteriosclerosis in which vascular smooth muscle cells (VSMC) play an important role. But the mechanism in which GH regulates the development of arteriosclerosis is not clear. In this study, we attempted to specify the genes up- or down-regulated by recombinant human GH(rhGH) in VSMC using a differential display method. We found that rhGH increased cytochrome oxidase subunit II / III mRNA in VSMC. Furthermore, the mRNA for mitochondrial transcription factor 1 (mtTF1), which regulates mitochondrial transcription and replication, was up-regulated by rhGH in a dose dependent manner using a quantitative PCR method. Pretreatment with a JAK2 inhibitor, AG490 (10nM) suppressed rhGH-induced rise in mtTF1 mRNA levels to the control levels. These findings suggest that GH up-regulates mtTF1 mRNA levels through JAK2 signaling in VSMC to increase cytochrome oxidase subunit II / III.