

アンジオテンシン II 刺激による血管平滑筋細胞の遊走に対する Src 阻害と MAP キナーゼ阻害効果の比較

奈良県立医科大学薬理学講座

趙 晶, 京谷陽司, 伊藤都裕,
長山功佑, 小澤健太郎, 吉栖正典

COMPARISON OF THE EFFECTS OF SRC INHIBITION AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE INHIBITION ON THE MIGRATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS STIMULATED BY ANGIOTENSIN II

JING ZHAO, YOJI KYOTANI, SATOYASU ITO,
KOSUKE NAGAYAMA, KENTARO OZAWA and MASANORI YOSHIKUNI
Department of Pharmacology, Nara Medical University

Received February 20, 2012

Abstract : Angiotensin II (AII) plays an important role in various cardiovascular diseases associated with vascular smooth muscle cell (VSMC) growth and migration. In our previous study, we investigated the effect of olmesartan, an angiotensin II receptor blocker, on AII-induced Src tyrosine kinase, extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation and rat aortic smooth muscle cell (RASMC) migration. We found that olmesartan inhibited AII-induced ERK1/2 and JNK activation at lower concentrations. On the other hand, PP2, a Src tyrosine kinase inhibitor, also inhibited AII-induced ERK1/2 and JNK activation, but its effect on ERK1/2 was less pronounced than that of olmesartan. However, both olmesartan and PP2 potently inhibited AII-induced RASMC migration. In the present study, we investigated the involvement of Src on AII-induced migration of RASMC using Src siRNA for gene silencing. Src siRNA was successfully introduced into RASMC using transfection procedures. We found that the inhibitory effect of Src siRNA on AII-induced JNK activation was more potent than on ERK1/2 activation in RASMC. In addition, Src siRNA effectively inhibited AII-induced RASMC migration to an extent similar to PP2. From these findings, it was inferred that direct inhibition of Src may be an effective option for VSMC growth and migration. Pharmacological or genetic inhibition of Src may be a strategy that can be used in addition to renin-angiotensin blockade for cardiovascular diseases involving AII, such as hypertension and atherosclerosis.

Key words : angiotensin II, cell migration, Src, siRNA, hypertension, atherosclerosis

はじめに

アンジオテンシン II (A II) は血管収縮やアルド

ステロンの放出刺激を介して高血圧を誘発するが、さらに血管のリモデリングや炎症、酸化ストレス産生に関与することが知られている¹⁾。粥状動脈硬化の

実験的モデル動物を用いた検討では、血管平滑筋細胞 (Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC) の過剰な増殖と遊走によって引き起こされる血管リモデリングは、動脈硬化の最も特徴的病態であり^{2,3)}、粥状動脈硬化の病変形成の重要なステップとなっている。先に述べた A II の作用は主に細胞表面の angiotensin II type 1 (AT₁) 受容体によって媒介されるものである。AT₁ 受容体を介した A II シグナルは様々な経路に関与し、G タンパクや受容体型、非受容体型チ

ロシンキナーゼに結合する。結果としてこのシグナルは、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼや protein kinase C (PKC), NAD (P) H oxidases の活性化、そして活性酸素種の産生を介して生理学的、病理学的な様々な効果を発現する⁴⁾。MAP キナーゼは VSMC を含む種々の細胞種の成長や遊走の決定的な制御因子として報告されている⁵⁻⁸⁾。さらに MAP キナーゼファミリーの活性化や非受容体型チロシンキナーゼのひとつである Src の活性化を介した

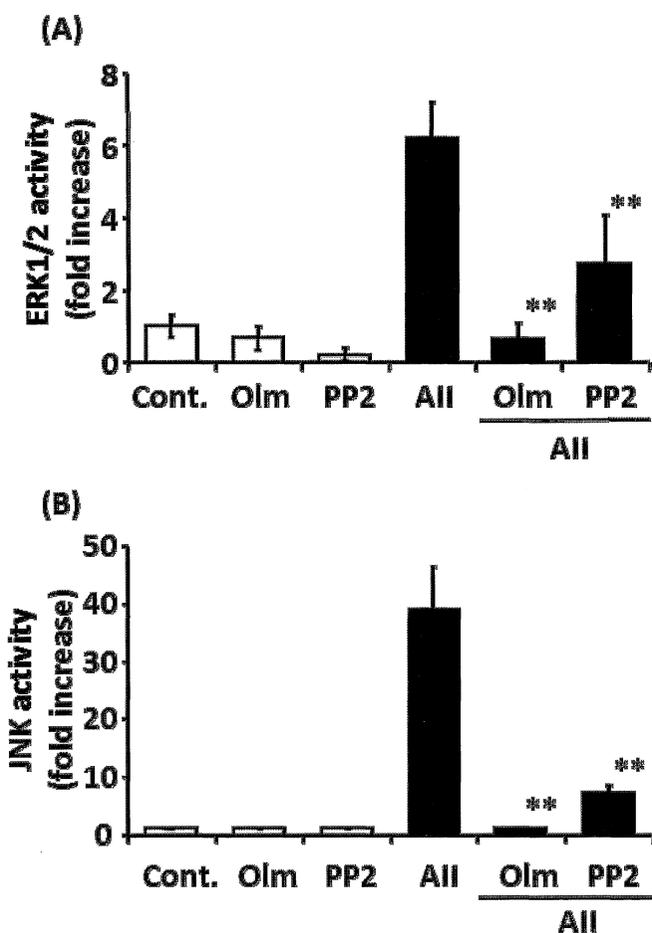


Fig. 1. Comparison of the inhibitory effects of olmesartan (Olm) and PP2 on angiotensin II (AII)-induced extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activations in rat aortic smooth muscle cells (RASMCs). After culturing in serum-free medium for 48 h, the cells were not pretreated, or pretreated with 10 nM olmesartan for 5 min or 10 μ M PP2 for 1 h. Then, the cells were stimulated with 10 nM of AII or left unstimulated for 5 min. The activities of ERK1/2 (A) and JNK (B) were measured as described under Materials and Methods. Densitometric analysis of each value was normalized by arbitrarily setting the densitometric value of control cells (Cont.) to 1.0. The asterisks represent values that were significantly different from the values of Ang II stimulation in normal RASMC (** P < 0.01). Each value represents a mean \pm S.D. ($n = 3$). (Modified from Ref. 19)

extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)⁹⁾, c-Jun N-terminal kinase (JNK)¹⁰⁾ の活性化は A II が誘導する VSMC の遊走¹¹⁾ にとって非常に重要であることも報告されている。VSMC の過剰な遊走は血管壁のリモデリングや新生内膜の形成, 中膜の肥厚を誘発する。これらは粥状動脈硬化へと導き, それに引き続く心血管疾患の原因となる。VSMC の増殖や遊走に関連した心血管疾患の病態形成における A II の役割は, これらのシグナル伝達経路の活性化を媒介して行われることが報告されている¹²⁾。

A II と AT₁ の結合部で競合するアンジオテンシン受容体拮抗薬 (Angiotensin Receptor Blockers, ARB) は, 降圧薬として利用されている。大規模臨床試験では, ARB は脳卒中や虚血性心疾患, 糖尿病性腎症の様な心血管や腎の合併症のリスクを下げる効果があることが示されている¹³⁻¹⁸⁾。それゆえ, AT₁ 受容体を遮断する事によって ARB は VSMC の増殖や遊走によって引き起こされる血管リモデリングや組織の損傷を抑制する可能性があり, この ARB の効果で心血管や腎のイベント抑制効果もたらされていると考えられる。以前に我々は, ARB の一つであるオ

ルメサルタン (RNH-6270) が, 培養ラット大動脈平滑筋細胞 (Rat Aortic Smooth Muscle Cell, RASMC) における A II 刺激による ERK1/2 と JNK の活性化と遊走を阻害することをみいだした¹⁹⁾。その際, オルメサルタンの MAP キナーゼ阻害効果は強いものの (Fig. 1), 細胞遊走阻害効果はより高い濃度で確認され (Fig. 2) その効果に乖離がみられた。また同時に, Src 阻害薬 PP2 の MAP キナーゼ阻害効果は顕著でないものの細胞遊走阻害効果は強いことが観察された (Fig. 1 及び 3)。そこで本研究では, A II 刺激による RASMC 細胞内情報伝達系と細胞遊走における Src チロシンキナーゼの役割について明らかにする目的で, Src 阻害薬 PP2 に加えて Src siRNA を用いて, A II 刺激による MAP キナーゼ活性化に対する阻害効果と細胞遊走に対する効果を検討した。

実験材料及び方法

試薬

オルメサルタン (RNH-6270) は第一三株式会社 (Tokyo) から提供頂いたものを使用した。そのほか以下の試薬を購入した: A II (Peptide Institute,

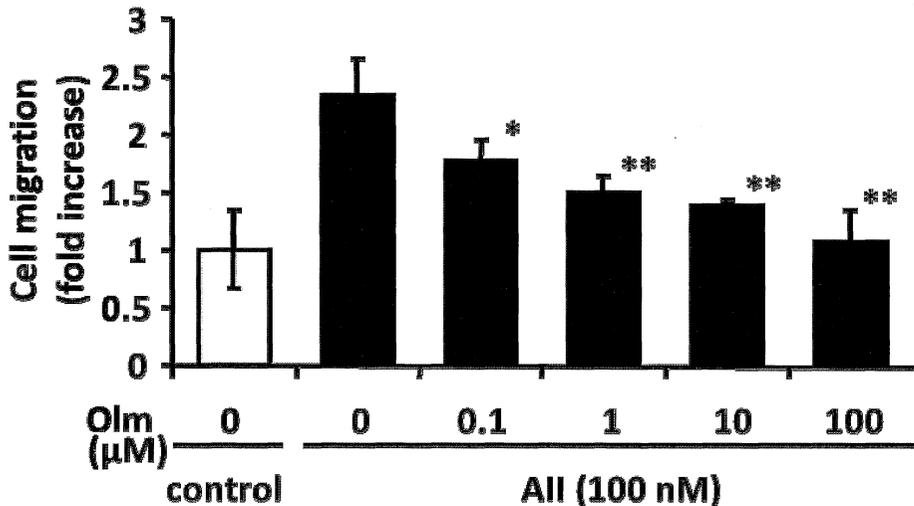


Fig. 2. Inhibitory effect of olmesartan on angiotensin II (AII) -induced rat aortic smooth muscle cell (RASMC) migration. Cells were not pretreated or were pretreated with olmesartan (Olm) for 5 min. Then, the cells were stimulated with 100 nM of AII, or left unstimulated, wounded using a yellow pipette tip, and cultured for 24 h. After these cells were stained and photographed, the cells between the 2 rims were counted under 5 different microscope fields. Values were normalized by arbitrarily setting the counts of control cells to 1.0. The asterisks represent values that were significantly different from the values of AII stimulation in normal RASMC (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Each value represents a mean \pm S.D. (n = 3). (Modified from Ref. 19)

Inc., Osaka) ; PP2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) ; phospho-ERK1/2 抗体と phospho-JNK 抗体 (Cell Signaling Technology, Danver, MA, USA) ; Src 抗体 (Upstate Technology, Lake Placid, NY, USA) ; Src の non-silencing siRNA (B-Bridge International, Inc., Cupertino, CA, USA) ; Src の Stealth select RNA interference (siRNA), Lipofectamine RNAiMAX, Src の活性化型を検出する抗 Src [pY418] リン酸化部位特異的抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した. その他の全試薬は市販の材料をそれ以上精製することなく使用した.

細胞

動物の処理は US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1985) から出版された "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" に基づき, 奈良県立医科大学の動物実験倫理委員会により承認を得た上で行った. 雄性 Sprague-Dawley 系ラットの胸部大動脈を切除し, 直ちに penicillin (100 U/ml) と streptomycin (100 μ g/ml) を含む

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に浸漬した. 結合組織と脂肪組織を試料から切除後に, 大動脈を切開し, 鋭利な鋏を使用して内膜表面を穏やかに擦ることで内皮細胞を取り除いた. 剥皮された大動脈を約 3 mm 四方片に切り, 3つの 35 mm 培養皿 (Falcon, Becton Dickinson, CA, USA) に内膜面を下に配置した. 10% のウシ胎仔血清と penicillin / streptomycin を含む DMEM を, 培養組織を覆うため, 配向性を阻害しないように穏やかに培養皿に加えた. 培養皿表面に遊走してくる VSMC を 7 ~ 10 日間培養し, 配置した大動脈片を滅菌した細いピンセットを使用して分離し, 培養液で洗浄した. 一旦, 細胞を 35 mm の培養皿にコンフルエントにし, 短時間のトリプシン処理により回収し, T-75 フラスコ (Iwaki, Osaka) に移して培養した (passage 1). 細胞遊走 assay を除く実験では, 初期の継代培養細胞 (passage 2-5) を serum-free DMEM による 48 時間の培養後に使用した. 細胞遊走 assay では serum-free DMEM による前処置を 24 時間とした. VSMC の純度は既報のごとく, 形態学的観察やミオシンの免疫染色に基づい

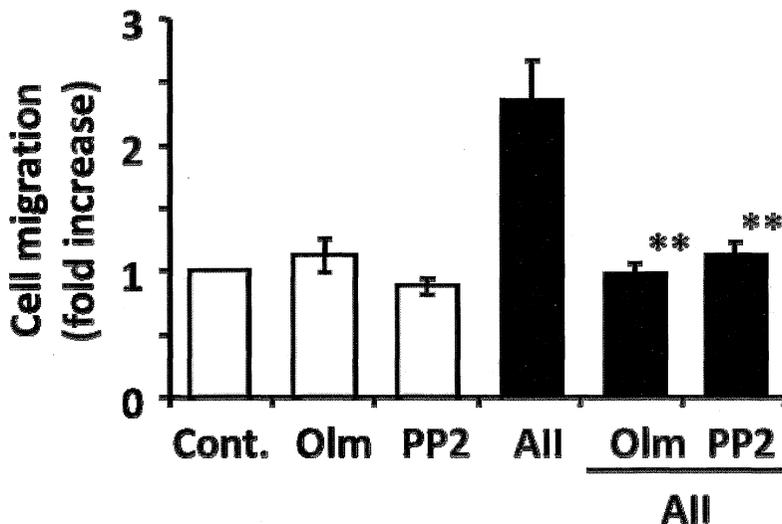


Fig. 3. Inhibitory effect of olmesartan (Olm) and PP2 on angiotensin II (All)-induced rat aortic smooth muscle cell (RASMC) migration. Cells were not pretreated, or were pretreated with 100 μ M olmesartan for 5 min or 1 μ M PP2 for 1 h. Then, the cells were stimulated with 100 nM of All or left unstimulated, wounded using a yellow pipette tip, and cultured for 24 h. After the cells were stained and photographed, the cells between the 2 rims were counted under 5 different microscope fields. Values were normalized by arbitrarily setting the counts of control cells (Cont.) to 1.0. The asterisks represent values that were significantly different from the values of All stimulation in normal RASMC (** $P < 0.01$). Each value represents a mean \pm S.D. (n = 3). (Modified from Ref. 19)

て 90% 以上になるように細胞を調製した²⁰⁾。細胞の生存率は 0.2% trypan blue の排除により観察しその結果は 98% 以上であった。

siRNA

トランスフェクションは発売元のプロトコールに従って行った。RASM C 細胞懸濁液を 6-well プレートに播種した。24 時間後、Opti-MEM に希釈した Src の RNAi duplex と Lipofectamine RNAiMAX を混和し、10~20 分間室温で放置した。

その他の既知の mammalian gene をターゲットとしない Src の non-silencing siRNA を negative control とした。その後、Src の RNAi duplex-Lipofectamine RNAiMAX 複合体を各 well に添加し、48 時間培養した後に実験に使用した。

ウエスタンブロット

細胞を sodium orthovanadate (1 mM) を含む氷冷 phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycotetraacetic acid (EGTA), 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 μ g/ml leupeptin 並びに 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む細胞溶解液を細胞に添加し、4℃にて 30~60 分間作用させた。その後、凍結融解に続いて超音波処理を行った後に遠心分離 (16,000 \times g, 4℃) し、上清の蛋白濃度を protein assay bicinchoninate kit (Nacalai Tesque, Kyoto) を用いて測定した。細胞可溶化液を sodium dodecyl sulfate (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、その蛋白を既報の方法²¹⁾に基づいて polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, CA, USA) に転移させた。その PVDF membrane を 5% スキムミルク含有 0.1% Tris-buffered saline Tween-20 (TBS-T) でブロッキングし、1 次抗体、2 次抗体 (horseradish peroxidase-conjugated) と順に反応させた。対象を enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いて発光させてフィルムに感光し、NIH image による濃度測定により定量化した。

Wound healing assay

細胞の遊走を測定するために、wound healing assay を行った。細胞を serum-free DMEM で 24 時間培養した後、条件に応じて MAP キナーゼ阻害薬、Src 阻害薬での前処置を行い、さらにオルメサルタンによる処理を行った。その後、細胞に A II を添加すると共に、チップで培養皿の底面に線状の傷をつけて 24 時間培養した。培養後、Diff-Quick (Sysmex, Kobe) で染色を行い、顕微鏡写真を撮影した。1 検体につき 5 視野撮影し、遊走してきた細胞の平均値をその値とした。

統計学的処理

実験は 3 回行い、測定値を means \pm S.D. (標準偏差) で示した。2-Way analysis of variance (ANOVA) で集団の偏差に差がないことを決定し、各群の有意差は Fisher's post-hoc test を伴う modified t-test で判定した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

結 果

A. RASM C における A II 刺激による ERK1/2, JNK 及び Src 活性化の時間経過と濃度依存性の検討

A II 刺激による MAP キナーゼ及び Src の活性化を評価するために、成長静止期にある RASM C に A II 刺激を加えた。A II 刺激による ERK1/2, JNK 及び Src の活性化の測定は材料及び方法の項で述べたとおりである。RASM C における ERK1/2 及び JNK は A II 刺激後 2 分以内に活性化され、5 分後にピークが見られた。同様に A II 刺激における Src の活性化は 2 分後にピークを迎え、その大きさは約 2 倍であった。JNK 及び Src の活性化はピークを迎えた後に減少に転じたが、ERK1/2 の活性化は 60 分間持続した。次に RASM C の A II による ERK1/2, JNK 及び Src 活性化の濃度依存性を検討した。RASM C における ERK1/2 及び JNK は A II の濃度依存的に活性化され、A II 濃度が 100 nM で最大となった。一方、Src は A II の濃度依存的に活性化され、A II 濃度が 10 nM でピークを迎えた。これらの結果は、以前に報告した我々の結果¹⁹⁾と同様であり、以下の実験では、RASM C の遊走実験を除いて A II 濃度を 10 nM に固定して実験を行い、A II 刺激による MAP キナーゼの活性化及

び Src の活性化については5分及び2分のインキュベーション時間で検討することにした。

B. RASMCs における Src siRNA の transfection による Src silencing の至適化

次に RASMCs における Src siRNA の導入効率を検討するため、Src silencing のための Src siRNA の至適化を行った (Fig. 4)。各 Src siRNA 量での Src knockdown の程度は、抗 Src 抗体によるウェスタンブロットによって行い、scramble siRNA (25 pmol, B-Bridge) を negative control とした。Src knockdown の効率は、Src siRNA 量を増加させるほど上昇し、25 pmol でほぼピークの 80% に達した (Fig. 4)。Src siRNA 量の上昇により細胞障害性が増すことの可能性を考慮し、本実験における至適 Src siRNA 量を 25 pmol に決定し、以下の実験では 25 pmol の Src siRNA を用いることにした。

C. RASMC における A II 刺激による ERK1/2 及び JNK の活性化に対する Src siRNA の阻害効果の検討

AT₁ 受容体は A II が誘導する細胞内シグナルの起点であり、そのシグナルは非受容体型チロシンキナーゼのひとつである Src や MAP キナーゼへと伝達される。Src は A II の誘導する ERK1/2 や JNK の活性化に重要な役割を果たしており、VSMC の遊走の主要制御因子のひとつである。以前に我々は、オルメサルタンと Src チロシンキナーゼ阻害薬である PP2 の A II 刺激による ERK1/2 及び JNK 活性化に対する阻害効果を比較検討した¹⁹⁾。その結果、オルメサルタン (10 nM) は RASMC における A II 刺激による ERK1/2 と JNK の活性化をどちらも強力に阻害したものの、PP2 は A II 刺激による ERK1/2 活性化に対する阻害効果は弱く、JNK 活性化も完全には抑制しなかった (Fig. 1)。この ERK1/2 と JNK の活性化に対する Src の関与の程度を明らかにするため、Src siRNA による発現阻害を行った細胞を用いて同様の実験を行った (Fig. 5)。その結果、PP2 を用いた実験結果と同

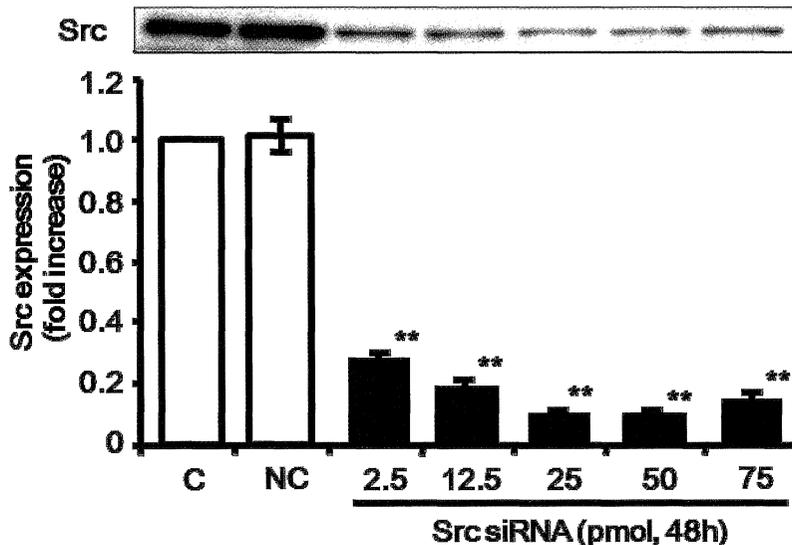


Fig. 4. Effect of siRNA for Src on Src expression in cultured rat aortic smooth muscle cells (RASMCs). Cells were transfected with the indicated amount of Src siRNA or negative control (NC) siRNA for 48h. After culturing in serum-free medium for 24 h, cells were harvested and assayed. Src expression was measured as described under Materials and Methods. Densitometric analysis of each value was normalized by arbitrarily setting the densitometric value of control cells to 1.0. Each value represents a mean \pm SD ($n = 3$). The asterisks represent values that were significantly different from the values of the control in normal RASMC (** $P < 0.01$).

様に Src siRNA の ERK1/2 活性化に対する阻害効果は中程度であり, JNK 活性化も完全には抑制されなかった。これらの実験結果から, RASMC における A II 刺激による ERK1/2 の活性化における Src の関与の程度は弱く, JNK の活性化により密接に関与していることが示唆された。

D. A II 刺激による RASMC 遊走に対する Src siRNA の阻害効果

以前に我々は, A II 刺激による RASMC の遊走に対するオルメサルタンの阻害効果の濃度依存性を検討し (Fig. 2), その効果を Src チロシンキナーゼ阻

害薬である PP2 のそれと比較検討した¹⁹⁾。オルメサルタンは A II による RASMC 遊走の阻害に高濃度を要したものの (Fig. 2), PP2 は比較的低い濃度で A II 刺激による RASMC 遊走を強力に阻害した (Fig. 3)。これらの結果と, PP2 の顕著ではない MAP キナーゼ阻害効果 (Fig. 1) との乖離を探究するため, PP2 の代わりに Src siRNA を用いて同様の実験を行った。その結果, PP2 を用いた実験結果と同様に Src siRNA は A II 刺激による RASMC 遊走を強力に阻害した (Fig. 6)。これらの実験結果は, A II 刺激による RASMC の遊走に対して, ERK1/2 や JNK の間接的な阻害よりも Src に対する直接阻害の方がより効果

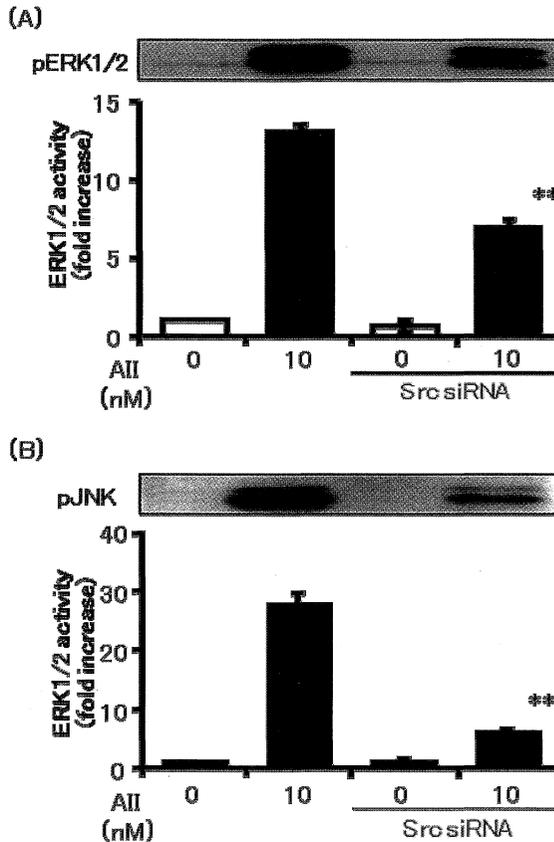


Fig. 5. Effect of Src siRNA on angiotensin II (AII)-induced extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activations in rat aortic smooth muscle cells (RASMCs). Cells were transfected with 25 pmol of Src siRNA or the same amount of negative control siRNA for 48h. After culturing in serum-free medium for 24h, transfected cells were treated with AII, or left untreated, for 5 min. ERK1/2 (A) and JNK (B) activities were measured as described under Materials and Methods. Densitometric analysis of each value was normalized by arbitrarily setting the densitometric value of control cells to 1.0. Each value represents a mean \pm SD (n = 3). The asterisks represent values that were significantly different from the values of the control in normal RASMCs (** $P < 0.01$).

が高い可能性を示唆している。

考 察

本実験研究において、我々はA II刺激によるRASCの遊走や細胞内シグナル等の変化に対するSrc siRNAの効果について検討した。我々の研究の主な知見は以下の通りである。まず、RASCにおいてSrc siRNA 25 pmolで80%に達するSrc蛋白質発現の抑制が観察され、Src遺伝子のsilencingにsiRNAが有効であることが確認された。Src siRNAはRASCにおけるA II刺激によるERK1/2活性化を中程度に抑制し、JNKの活性化の阻害はERK1/2の阻害より顕著であった。次に、Src siRNAによるA II刺激によるRASCの遊走の阻害の程度はSrc阻害薬のPP2と同程度に強力であり、Src遺伝子のsilencingがRASCの遊走阻害に効果を示すことが明らかになった。

ERK1/2とJNKの活性化はA II刺激によるRASCの遊走において、重要な役割を果たしている^{22, 23}。細胞の遊走は細胞骨格の再構築が必要とな

り、細胞骨格に関わるチロシキナーゼのリン酸化や接着斑複合体の形成に参与する²⁴。VSMCにおいて、A II刺激によって誘導される接着斑複合体形成と細胞骨格の再構築はAT1受容体刺激によって媒介され、c-Srcを必要とすることが報告されている²⁵。加えて、Srcのリン酸化はERK1/2とJNKの活性化を経て起こるA II刺激によるVSMCの遊走に必要な不可欠であるとも報告されている¹¹。以前の我々の研究において、Src阻害薬のPP2がERK1/2活性化を中程度に抑制し、JNK活性化の阻害はERK1/2の阻害より強力で、PP2の阻害効果に差がみられた¹⁹。本研究で我々は、PP2の代わりにSrc siRNAを用いて同様の検討を行い、やはりSrc阻害は、A II刺激によるERK1/2活性化よりもJNKの活性化を顕著に阻害することが確認された (Fig. 5)。この実験結果は、Srcが少なくとも部分的にA II刺激によるERK1/2とJNKの活性化の上流に存在することを示している。また、Src siRNAによるSrc阻害は、A II刺激によるERK1/2活性化よりもJNKの活性化を顕著に抑制したことから、A II刺激によるSrcのリン酸化はERK1/2の活

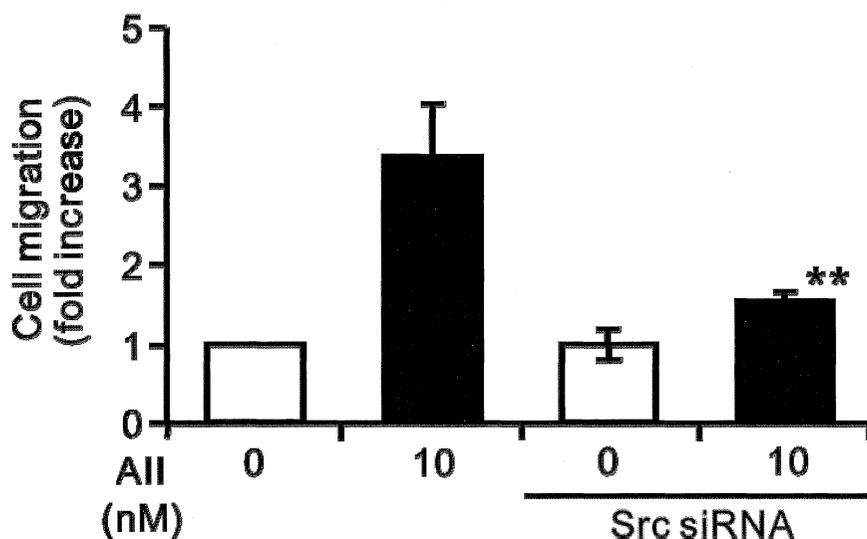


Fig. 6. Inhibitory effect of Src siRNA on angiotensin II (AII)-induced rat aortic smooth muscle cell (RASC) migration. Cells were transfected with 25 pmol of Src siRNA or the same amount of negative control siRNA for 48 h. After culturing in serum-free medium for 24 h, transfected cells were stimulated with 100 nM of AII or left unstimulated. Then, the cells were wounded using a yellow pipette tip, and cultured for 24 h. After the cells were stained and photographed, the cells between the 2 rims were counted under 5 different microscope fields. Values were normalized by arbitrarily setting the counts of control cells to 1.0. The asterisks represent values that were significantly different from the values of AII stimulation in normal RASC (** $P < 0.01$). Each value represents a mean \pm S.D. ($n = 3$).

活性化よりも JNK の活性化により深く寄与することが判明した。これらの結果は、VSMC において A II による ERK1/2 の活性化は主に c-Src に依存する²⁶⁾ という以前の報告と異なっている。現時点では、この矛盾を説明するのは難しい。しかしながら、私たちの実験結果からは、RASMC における A II 刺激による ERK1/2 の活性化経路が一部 Src を介したものであるもの、それ以外の経路の存在の可能性も示唆している。

多くの臨床試験はアンジオテンシン変換酵素 (Angioten Converting Enzyme, ACE) 阻害薬と ARB が高血圧患者の心血管イベントのリスクを減少すると報告している²⁷⁻³⁰⁾。これらの知見を基にすると、ARB と ACE 阻害薬は、A II の誘導する細胞の遊走や増殖と関連した粥状動脈硬化形成を抑制することが推測できる。この概念は、オルメサルタンが顕著に A II 刺激による RASMC の遊走を阻害したという我々の以前の研究によっても支持される¹⁹⁾。しかしその際、オルメサルタンの MAP キナーゼ阻害効果は強いものの (Fig. 1)、細胞遊走阻害効果はより高い濃度で確認され (Fig. 2) その効果に乖離がみられた。また同時に、Src 阻害薬 PP2 の MAP キナーゼ阻害効果は顕著でないものの細胞遊走阻害効果は強いことが観察された (Fig. 1 及び 3)。そこで我々は、PP2 の代わりに Src siRNA を用いて A II 刺激による RASMC 遊走の阻害効果を検討した。以前の我々の検討 (Fig. 3) と同様に、Src siRNA は A II 刺激による RASMC 遊走を強力に阻害した (Fig. 6)。これらの実験結果は、Src は細胞の遊走において決定的な因子であるという以前の研究報告の結果と一致している^{7, 8)}。Src siRNA は A II 刺激による ERK1/2 の活性化に対しては部分的な阻害効果を示したが (Fig. 5)、Src siRNA は A II 刺激による RASMC の遊走に対しては強力な阻害効果を示した (Fig. 6)。しかしながら、Src siRNA による RASMC 遊走の阻害効果は完全ではなく、A II 刺激による RASMC の遊走において、Src のリン酸化以外の細胞内シグナル伝達経路が関与している可能性を示唆している。その上、オルメサルタンが A II 刺激による RASMC の遊走を 100 μ M を超える高濃度で阻害したという結果は、A II 刺激による ERK1/2, JNK の活性化に対する阻害の結果と一致しない (Fig. 1, 及び 2)。しかしながら、実験で用いた Wound

healing assay のような手法の場合には、A II の刺激によって細胞増殖や細胞肥大など細胞遊走以外のメカニズムにも影響する可能性がある。この可能性は、これらの A II が誘導する様々な効果を阻害するためには他のアプローチが必要であることを示唆している。以上をまとめると、我々の実験研究の結果から Src のリン酸化を介した細胞内シグナル伝達系の活性化は A II 刺激による RASMC の遊走に必要な不可欠であることが明らかになり、間接的な MAP キナーゼ阻害よりも Src の直接阻害の方がより効果の高い可能性を示唆している。

結 論

本研究において、我々は RASMC において Src siRNA が Src 遺伝子の silencing に有効であることを明らかにした。さらに、Src siRNA を用いた RASMC における A II 刺激による ERK1/2 活性化と JNK 活性化の阻害効果の比較実験により、A II 刺激による Src のリン酸化は ERK1/2 の活性化よりも JNK の活性化により深く関与することが判明した。また、Src siRNA による A II 刺激による RASMC 遊走の阻害の程度は Src 阻害薬 PP2 と同程度に強力であり、Src 遺伝子の silencing が RASMC の遊走阻害に効果を示すことが明らかになった。これらの知見は、Src チロシンキナーゼの直接阻害が、ARB 等による降圧作用に加えて、VSMC の遊走が関わる血管リモデリングの抑制作用を有する可能性を示している。

謝 辞

本研究の一部は、(財)奈良県対ガン協会ガン研究助成事業「Src 阻害薬の血管新生抑制効果の比較検討」(主任研究者:吉栖正典)によって行われたものである。ここに感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Touyz RM : Intracellular mechanisms involved in vascular remodeling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensinII. *Exp Physiol.* **90** :449-455, 2005.
- 2) Owens GK, Reidy M : Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats

- by aortic coarctation. *Circ Res.* **57** : 695-705, 1985.
- 3) Bevan RD : An autoradiographic and pathological study of cellular proliferation in rabbit arteries correlated with an increase in arterial pressure. *Blood Vessels.* **13** : 100-128, 1976.
 - 4) Mehta PK, Griendling KK : Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292** : C82-C97, 2007.
 - 5) Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J : p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene.* **15** : 2169-2177, 1997.
 - 6) Denes L, Jednakovits A, Hargitai J, Penzes Z, Balla A, Talosi L, et al. : Pharmacologically activated migration of aortic endothelial cells is mediated through p38 SAPK. *Br J Pharmacol.* **136** : 597-603, 2002.
 - 7) Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, et al. : Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation.* **105** : 2404-2410, 2002.
 - 8) Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K : JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature.* **424** : 219-223, 2003.
 - 9) Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M : Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **71** : 620-630, 1992.
 - 10) Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, et al. : Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20** : 940-948, 2000.
 - 11) Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kagami S, Izawa Y, Fujita Y, et al. : Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Mol Pharmacol.* **65** : 832-841, 2004.
 - 12) Kim S, Iwao H : Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* **52** : 11-34, 2000.
 - 13) Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D : Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* **345** : 861-869, 2001.
 - 14) Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J : The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* **345** : 870-878, 2001.
 - 15) Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE : Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE) : a randomized trial against atenolol. *Lancet.* **359** : 995-1003, 2002.
 - 16) Lithell H, Hansson L, Skoog I : The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens.* **21** : 875-886, 2003.
 - 17) McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K : Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet.* **362** : 767-771, 2003.
 - 18) Turnbull F : Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet.* **362** : 1527-1535, 2003.
 - 19) Kyotani Y, Zhao J, Tomita S, Nakayama H,

- Isosaki M, Uno M, et al : Olmesartan inhibits angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Pharmacol Sci.* **113** : 161-168, 2010.
- 20) Ohlstein EH, Douglas SA, Sung CP, Yue TL, Loudon C, Arleth A, et al : Carvedilol, a cardiovascular drug, prevents vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and neointimal formation following vascular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** : 6189-6193, 1993.
- 21) Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC : Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* **275** : 11706-11712, 2000.
- 22) Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL : Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension.* **38** : 56-64, 2001.
- 23) Takahashi T, Kawahara Y, Taniguchi T, Yokoyama M : Tyrosine phosphorylation and association of p130Cas and c-Crk II by ANG II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* **274** : H1059-H1065, 1998.
- 24) Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, 168 Y Kyotani et al et al. : Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* **377** : 539-544, 1995.
- 25) Ishida T, Ishida M, Suero J, Takahashi M, Berk BC : Agonist stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src. *J Clin Investig.* **103** : 789-797, 1999.
- 26) Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC : Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **82** : 7-12, 1998.
- 27) Mochizuki S, Dahlöf B, Shimizu M, Ikewaki K, Yoshikawa M, Taniguchi I, et al. : Valsartan in a Japanese population with hypertension and other cardiovascular disease (Jikei Heart Study) : a randomised, open-label, blinded endpoint morbidity-mortality study. *Lancet.* **369** : 1431-1439, 2007.
- 28) Kondo J, Sone T, Tsuboi H, Mukawa H, Morishima I, Uesugi M, et al. : Effects of low-dose angiotensin II receptor blocker candesartan on cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am Heart J.* **146** : E20, 2003.
- 29) Fox KM : EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators: Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, doubleblind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet.* **362** : 782-788, 2003.
- 30) Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G : Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* **342** : 145-153, 2000.