

タウリンによる PDGF-BB 増殖シグナルの抑制作用

細川 優¹⁾, 寺嶋 正治²⁾, 谷河 精規²⁾, 今田 啓介³⁾

(¹⁾実践女子大学・生活科学部*, (²⁾島根医科大学・第2生化学教室**, (³⁾大正製薬・セルフメディケーション研究所***)

Inhibitory effects of taurine on platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) signaling in rat vascular smooth muscle cells

Yu HOSOKAWA¹⁾, Masaharu TERASHIMA²⁾, Yoshinori TANIGAWA²⁾, and Keisuke IMADA³⁾

¹⁾Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Shimane Medical University

³⁾Self Medication Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co.

The effects of taurine on PDGF-BB-induced proliferation, immediate-early gene expression, and MAP kinase (MAPK) activation in rVSMCs were investigated. Taurine significantly inhibited both PDGF-BB (10 ng/ml)-induced proliferation and DNA synthesis on rat VSMCs in a concentration-dependent manner. Similarly, taurine significantly inhibited the mRNA expression of c-fos, c-jun, and c-myc induced by PDGF-BB in A7r5 VSMCs. In addition, taurine significantly inhibited PDGF-BB-induced phosphorylation of P44/P42 MAPK (ERK1/ERK2) in rVSMCs. These results suggest that taurine may inhibit PDGF-BB-induced rVSMC proliferation, and its activity may be mediated, at least in part, by down regulation of MAPK and immediate-early gene expression.

タウリンの抗動脈硬化作用は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラットを用いた研究で以前から示されていた¹⁾。そのメカニズムに、血清コレステロールの低下作用²⁾を介する可能性が考えられていた。しかし、高コレステロール食を負荷したウサギでは、血清コレステロールの低下は認められないが、タウリンは血管の内膜肥厚を抑制することが報告されている³⁾。最近のラットやウサギを用いた研究^{4,5)}では、タウリンは血管でのTBA反応性物質の蓄積を抑えることから、動脈硬化の発症・進展抑制には、抗酸化作用が関与する可能性が強く示唆されている。動脈硬化の発症・進展は複雑な過程をたどり、血管中膜平滑筋細胞 (Vascular smooth muscle cells, VSMC) の形質変換と、それに伴う遊走と増殖能の亢進も重要な役割を果たしている。動脈硬化巣では、種々のサイトカインや増殖因子が分泌される。なかでも血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) は、強力な動脈硬化促進因子で、VSMCの形質変換や増殖、遊走の誘導に中心的な役割を果たしている。

本研究では、タウリンの抗動脈硬化作用のメカニズムを探る目的で、ラットVSMC (rVSMC) に対する作用を解析した。

実験方法

1. ラット血管中膜平滑筋細胞 (rVSMC) の分離

rVSMCは、4週齢のSD系雄性ラットの胸郭動脈より、Thommes等の方法⁶⁾に準じて、コラゲナーゼ消化で分離した。

*所在地：日野市大坂上4-1-1 (〒191-8510)

**所在地：出雲市塩治町89-1 (〒693-8501)

***所在地：大宮市吉野町1-403 (〒330-8530)

2. 細胞増殖とDNA合成の測定

細胞増殖能では、トリプシン処理で細胞を剥がし、細胞数を計測した。DNA合成は、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) のDNAへの取り込みをELISA法 (Roche Diagnostics) で測定した。

3. 初期遺伝子の発現測定

この実験では、ラット平滑筋細胞培養株 A7r5 を用いて検討した。A7r5 細胞を約 80% コンフレントまで培養後、低血清培地で休止期に同調した。細胞を PDGF-BB で 30 分間刺激後、細胞をハーベストし、AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法で総 RNA 分離した。c-fos, c-jun, c-myc の mRNA レベルは、RT-PCR 法で測定した。測定は、前報の通りに行った⁷⁾。

4. P44/P42 MAP キナーゼ (MAPK) の検出

P44/P42 MAPK とリン酸化 P44/P42 MAPK は、抗 P44/P42 MAPK 抗体および抗リン酸化抗体 (New England Biolabs) を用いてウエスタンブロット法で前報に準じて検出した⁸⁾。

実験結果と考察

1. 細胞増殖の抑制

最初に rVSMC の増殖能を検討した。細胞は、10~15% コンフレントまで培養後、低血清培地 (DMEM/0.5% FBS) で 2 日間培養して休止期に同調した。さらに、新鮮低血清培地に変えて実験に用いた。図 1 に見られるように、低血清培地下では細胞数の増加はほとんど認められない。ヒトリコンビナント PDGF-BB を 10 ng/ml の濃度で添加すると、細胞数は 7 日後には約 3.5 倍、15 日後には約 8 倍に増加し良好な増殖能を示した。PDGF-BB と同時に 0.5 mM のタウリンを添加すると、7 日および 15 日後とも PDGF-BB による細胞増殖の亢進が有意に抑えられた。データは示さないが、タウリンは塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) による増殖亢進も有意に抑制した。

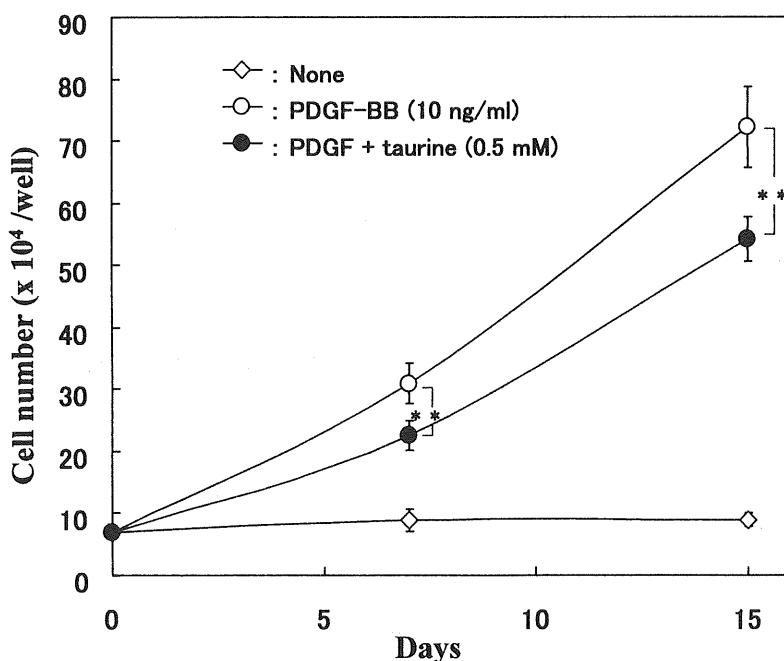


Fig. 1 The effect of taurine on the growth of rVSMCs induced by PDGF-BB. Cells were stimulated with 10 ng/ml PDGF-BB. Medium was changed on days 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13. Values were means \pm SD for 4 cultures. ***P < 0.01.

2. タウリンの濃度依存性

図2では、タウリンの濃度依存性を検討した。この実験では、細胞を5日間培養した。統計的に有意な細胞増殖の阻害効果は、タウリン濃度が0.2 mMから観察され、0.4 mMではさらに著しく阻害された。しかし、それ以上の濃度では、さらなる阻害効果は得られなかった。ヒト血漿中のタウリン濃度は低く0.039~0.089 mMであるが、タウリンを服用すると一時的にせよ0.2 mM程度まで上昇する。今回、効果が観察されたタウリン濃度は、生理的に起こりうる範囲内と判断される。

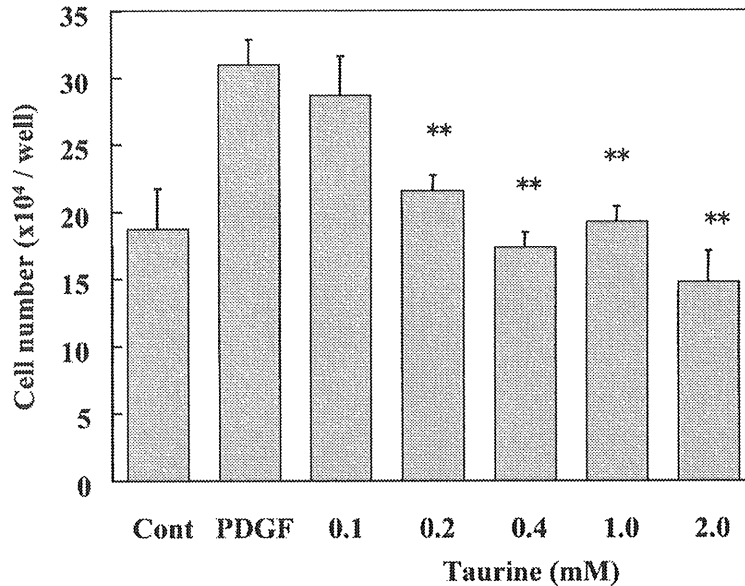


Fig. 2 Dose-dependent effects of taurine on PDGF-BB-induced growth of rVSMCs. Cells were cultured for 5 days. Values were means \pm SD for 5 cultures. **P < 0.01 vs. PDGF-BB.

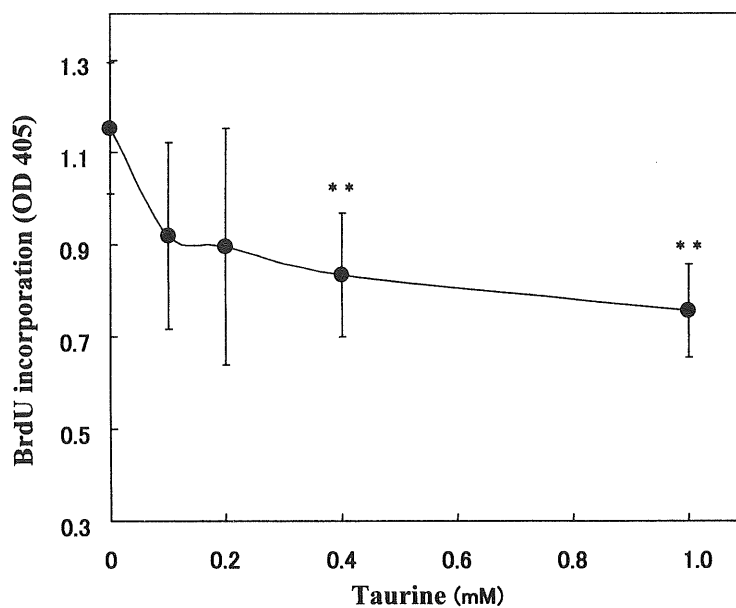


Fig. 3 The effect of taurine on PDGF-BB-induced DNA synthesis in rVSMCs. Cells were pre-treated for 2 h with various concentrations of taurine before stimulation with PDGF-BB (10 ng/ml) for 24 h. BrdU (15 μ M) was added final 4 h. Values were means \pm SD for 6 wells. **P < 0.01 vs. PDGF-BB alone.

3. DNAへのBrdUの取り込み抑制

図3では、BrdUの取り込みでDNA合成を測定した。休止期のrVSMCをPDGF-BBで20時間刺激した後に、BrdUで細胞を4時間ラベルした。タウリンは、PDGF-BBの2時間前から添加した。ばらつきは大きいですが、PDGF-BBで誘導されるBrdUの取り込みも、0.4 mM以上のタウリン濃度で有意に抑制された。このことから、細胞増殖の抑制はDNA合成の低下に起因することが確かめられた。

4. 初期遺伝子の発現抑制

初期遺伝子 (c-fos, c-jun, c-myc) の発現をRT-PCR法で検討した。なお、この実験ではラット血管平滑筋細胞由来培養株A7r5を用い、PDGF-BB (10 ng/ml) で細胞を30分間刺激した。なお、タウリンは、PDGF-BBの2時間前に添加した。図4と図5に示すように、PDGF-BBはc-fosやc-junのmRNA発現を著しく誘導する。c-junのmRNA発現は、1 mMのタウリン濃度から50%に抑制され、さらに濃度を上げててもそれ以上の発現低下は認められなかった (図5)。一方、c-fosのmRNA発現は、1 mMで80%、2 mMで44%とタウリンにより濃度依存的に抑制された (図4)。データは示さないが、c-mycの発現も同様に、1 mMで80%、2 mMで59%と濃度依存的に抑制された。細胞増殖と初期遺伝子の発現において、タウリンの濃度依存性に違いが認められた。その理由を正確に説明できないが、mRNAの測定にRT-PCR法を用いており、定量性が関係しているかもしれない。c-fosやc-junの発現は、セルサイクルG0からG1への移行期に上昇することから、タウリンはG0からG1への移行を抑制又は遅らせる可能性もある。また、c-fos, c-junは、細胞増殖に関係する転写因子であることも示唆されており⁹⁾、タウリンの増殖抑制メカニズムの一部にはこれらの初期遺伝子の発現抑制が関係している可能性もある。一方、タウリンの構造類似体であるタウロシアミン (GES) にも増殖抑制作用が認められている¹⁰⁾。今回、初期遺伝子の発現に対するGESの効果も検討したが、c-fosとc-junのmRNA発現は、GESで抑制されなかった。従って、タウリンとGESの作用メカニズムが異なると考えられる。

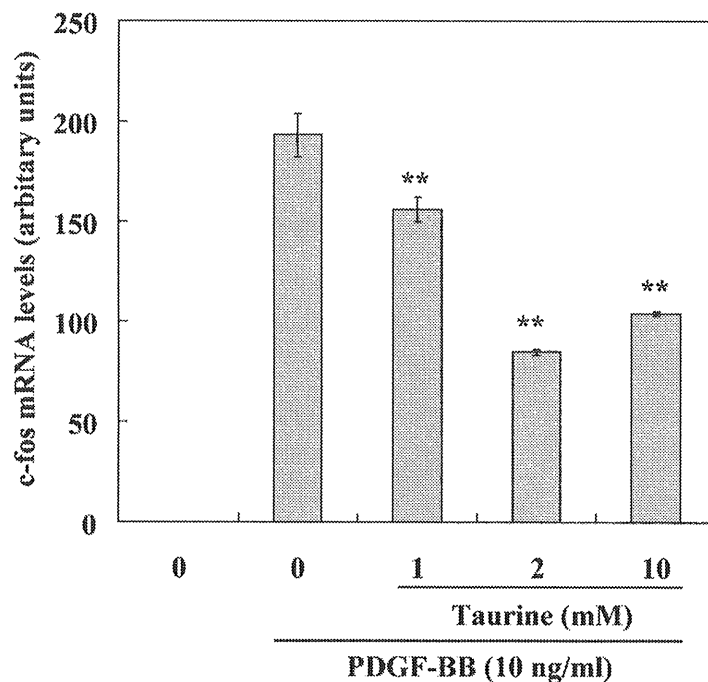


Fig. 4 The effect of taurine on PDGF-BB-induced c-fos mRNA expression in A7r5 VSMCs. Cells were pretreated for 2 h with various concentrations of taurine before stimulation with PDGF-BB for 30 min. Values were means \pm SD for 3 cultures. **P < 0.01 vs. PDGF-BB alone.

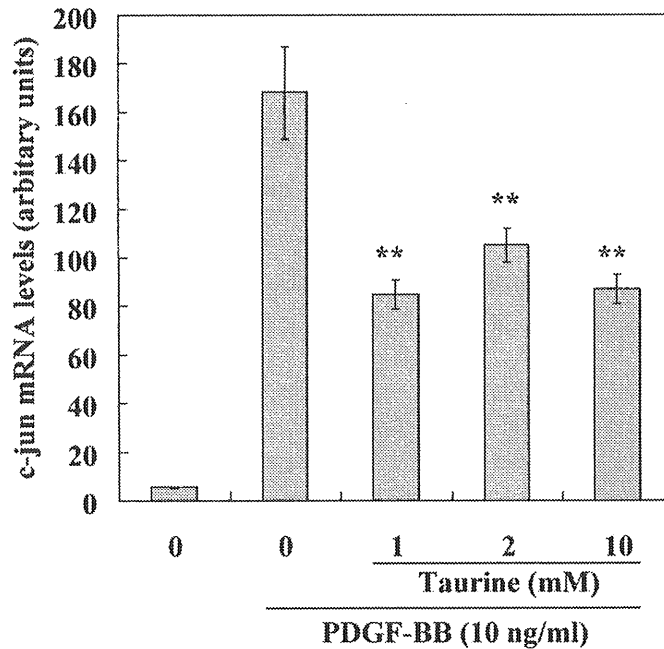


Fig. 5 The effect of taurine on PDGF-BB-induced c-jun mRNA expression in A7r5 VSMCs. **P < 0.01 vs. PDGF-BB alone.

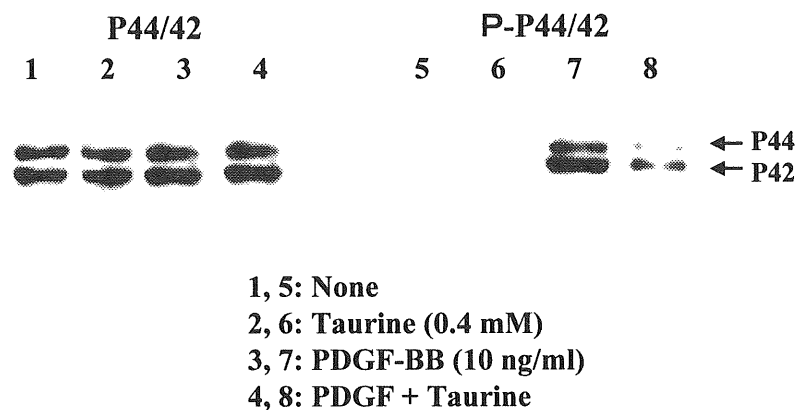


Fig. 6 The effect of taurine on PDGF-BB-induced phosphorylation of P44/P42 MAPK (ERK1/ERK2) in rVSMCs. Cells were pretreated for 2 h with or without of 0.4 mM taurine before stimulation with PDGF-BB for 45 min. P-P44/P42: Phosphorylated P44/P42.

5. MAPKの活性化

PDGFの増殖シグナルでは、Ras-MAPキナーゼカスケードが重要な役割を果たすことが認められている¹¹⁾。次に、MAPK (ERK1/ERK2) のリン酸化を検討した。実験では、rVSMCをPDGF-BB (10 ng/ml) で45分刺激した。図6に示すように、P44/P42 MAPK量はPDGF-BBやタウリンの添加で変化しない (lanes 1-4)。一方、リン酸化P44/P42 MAPKは、休止期細胞 (図6 lane 5) やタウリンだけの添加 (lane 6) では全く検出できない。細胞をPDGF-BBで刺激するとリン酸化抗体反応性バンドの著しい増加が認められた (lane 7)。0.4 mMタウリンの添加は、P44/P42 MAPKのリン酸化を著しく抑制した (lane 8)。以上の結果から、タウリンの増殖抑制メカニズムの一部には、

MAPKの活性化およびその下流に存在するc-fos, c-junの発現抑制が関与すること可能性が強く示唆された。PDGF-BBの増殖シグナルは, PDGFの受容体への結合, 受容体型チロシンキナーゼのリン酸化, アダプター分子の結合, Rasの活性化, Raf (MAPKKK) の活性化, MKK1/MKK2 (MAPKK) の活性化, P44/P42 MAPK (ERK1/ERK2) の活性化へと続く一連のカスケードで伝達される。一連のカスケードにおけるタウリンの作用点と作用機序は現在不明であり, 今後の研究における中心課題である。

文 献

- 1) Murakami, S., Yamagishi, I., Asami, Y., Ohta, Y., Toda, Y., Nara, Y. and Yamori, Y. (1996) *Pharmacology*. 52: 303.
- 2) Yokogoshi, H., Mochizuki, H., Nanami, K., Hida, Y., Miyachi, F. and Oda, H. (1999) *J. Nutr. Sep*:129: 1705.
- 3) Petty, M.A., Kintz, J. and DiFrancesco, G.F. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 180: 119 - 27.
- 4) Sethupathy, S., Elanchezhiyan, C., Vasudevan, K. and Rajagopal G. (2002) *Indian J. Exp. Biol.* 40: 1169.
- 5) Murakami, S., Kondo, Y., Sakurai, T., Kitajima, H. and Nagate, T. (2002) *Atherosclerosis*. 163: 79.
- 6) Thommes, K.B., Hoppe, J., Vetter, H. and Sachinidis, A. (1996) *Exp. Cell Res.* 226 :59.
- 7) Imada, K., Hosokawa, Y., Terashima, M., Mitani, T., Tanigawa, Y., Takenaga, T. and Kurachi, M. (2003) *Adv. Exp. Med.* 526: 5.
- 8) Terashima, M., Mitani, T., Hosokawa, Y., Nariai, Y., Imada, K., Kageyama, E. and Tanigawa, Y. (2003) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49: 187.
- 9) Angel, P. and Karin, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1075: 129.
- 10) Zhang, X., Tenner, T.E.Jr and Lombardini, J.B. (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57: 1331.
- 11) Bornfeldt, K.E., Raines, E.W., Graves, L.M., Skinner, M.P., Krebs, E.G. and Ross, R. (1995): *Ann. NY Acad. Sci.* 766: 416.