

cAMP response element binding protein(CREB)は アンジオテンシンIIとTNF α のシグナル伝達に重要な役割を果たす

市来 俊弘

要 旨：血管平滑筋細胞におけるcAMP response element binding protein(CREB)の活性化機序と機能について検討した。アンジオテンシンIIやトロンビンなどのGqにカップルする7回膜貫通型受容体はERKおよびp38MAPKを介してCREBを活性化すると考えられた。一方、腫瘍壊死因子(TNF α)によるCREBの活性化はp38MAPKに依存していた。ドミナントネガティブCREBを過剰発現させると、アンジオテンシンIIによる血管平滑筋細胞の肥大やラット頸動脈のバルーン傷害後に生じる新生内膜形成が抑制された。またドミナントネガティブCREBは、TNF α による血管平滑筋細胞の遊走や内皮細胞における接着因子の発現を抑制した。これらの結果からCREBはさまざまな刺激によって異なった経路を介して活性化され、血管リモデリングの過程に関与する可能性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 377-381)

Key words: angiotensin II, tumor necrosis factor α , cAMP response element binding protein, thyroid hormone, mitogen-activated protein kinase

はじめに

cAMP response element binding protein(CREB)は細胞外の種々の刺激によって活性化される転写因子であり、細胞の増殖や分化、適応の過程などにおいて重要な役割を果たす。CREBはTリンパ球の分化や増殖、成長ホルモンの産生や発育などに重要な役割を果たすことが報告されている。また中枢神経ではCREBは学習と記憶に関与する分子と考えられている。血管病変形成におけるCREBの役割について、われわれの知見を中心に概説した。

CREBの構造

CREBは、ソマトスタチン遺伝子のcAMP応答性配列(cAMP response element: CRE, TGACGTCA)に結合する43KDaの蛋白として精製された¹⁾。遺伝子は11個のエクソンからなり、alternative splicingにより α 、 Δ 、 β の3種類のアイソフォームが作られる。これらのアイソフォームは、ほとんどの組織において発現しているが、機能的な違いがあるかどうかは明確ではない。

CREBは二量体として標的のDNA配列に結合する。二量体化はC端のleucine zipper domain(ZIP)と、ZIPのすぐN端側にあるリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸に富む領域(basic domain)によって生じる。

CREBの活性化

CREBは133番目のセリン残基がリン酸化されることにより活性化される²⁾。CREBのセリン133をリン酸化する代表的なキナーゼはcAMPによって活性化されるprotein kinase A(PKA)である³⁾。cAMPがPKAのregulatory subunitに結合するとcatalytic subunitが遊離し核へ移行する。そしてCREBをリン酸化すると考えられている。CREBがリン酸化されている時間の長さはCREB依存性の遺伝子発現を誘導する効率と相関すると考えられている。

当初CREBはアデニルサイクラーゼの活性化などcAMPの細胞内濃度を上昇させる刺激によってのみ活性化されると考えられていた。しかしCREBのセリン133のリン酸化を認識する抗体の開発によって、CREBはさまざまな細胞外の刺激によって活性化されること

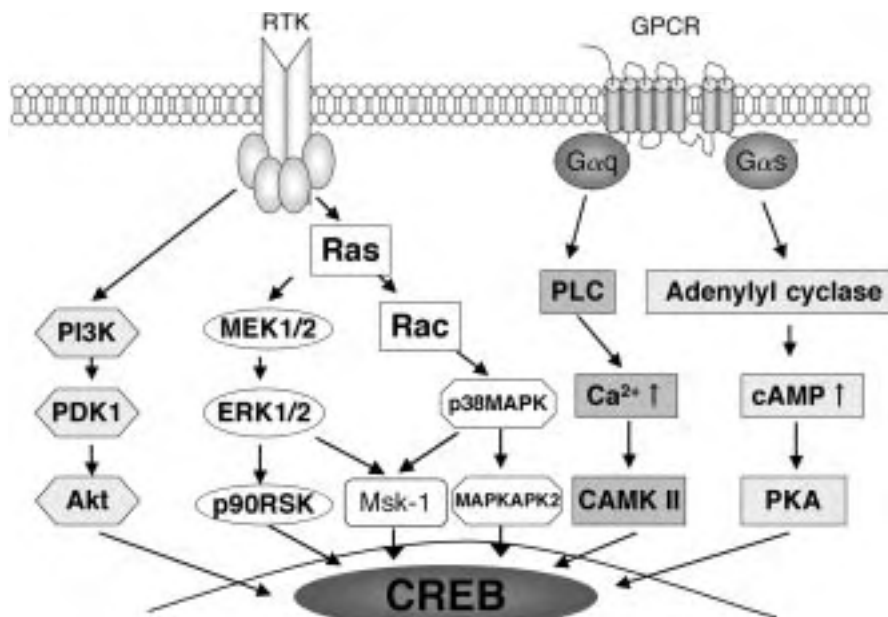


Figure 1 Signaling pathways for the activation of CREB.

CREB is phosphorylated by PKA (protein kinase A), calmodulin dependent protein kinase (CaMK), p90RSK, Akt, and MAPKAPK-2 (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase).

MAPK: mitogen-activated protein kinase, PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase, ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, AC: adenylyl cyclase, RTK: receptor tyrosine kinase, GPCR: G protein coupled receptor

が明らかになってきた(**Fig. 1**)。多くの実験からCREBを活性化するキナーゼが新たに同定されてきた。その一つがp90RSKである⁴⁾。p90RSKはribosomal protein S6をリン酸化する酵素と考えられていたが、実際はS6蛋白はリン酸化せずCREBなどの転写因子が主な基質であることが明らかとなってきた。p90RSKはextracellular signal-regulated protein kinase(ERK)とよばれるmitogen-activated protein kinase(MAPK)によって活性化される。また別のMAPKであるp38MAPKもMAPK activated protein kinase-2(MAPKAPK-2)を介してCREBをリン酸化する⁵⁾。さらにERKとp38MAPKによって活性化されるMsk-1(mitogen- and stress-activated protein kinase-1)がCREBを活性化することも報告されている。

細胞内Ca²⁺の上昇はcalmodulin dependent protein kinase (CaMK)を活性化しCREBのリン酸化およびCREB依存性の遺伝子発現を活性化する⁶⁾。さらに、最近phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K)によって活性化されるAkt/protein kinase Bとよばれるserine/threonine kinaseもCREBをリン酸化することが報告されている⁷⁾。

心臓・血管におけるCREBの機能

α myosin heavy chainプロモーターを用いてマウスの心筋細胞にドミナントネガティブCREBを過剰発現させると、拡張型心筋症に似た心臓の拡張と収縮不全を引き起こすことが報告されている⁸⁾。しかしこのトランスジェニックマウスの心筋ではアポトーシスの増加は観察されなかった。また心臓の虚血・再灌流モデルにおいてCREBがPKA依存性に活性化されると報告されている⁹⁾。しかしながら、虚血心筋におけるCREBの役割は現在のところ明らかではない。

血管におけるCREBの役割は十分には解明されていない。Linらは、ノルエピネフリンが α 1アドレナリン受容体を介して、PKA依存性にCREBを活性化すると報告している¹⁰⁾。また血管内皮細胞において、vascular endothelial growth factorは、PKCおよびp38MAPK依存性にCREBを活性化することから、CREBがangiogenesisに関与する可能性が示唆されている¹¹⁾。

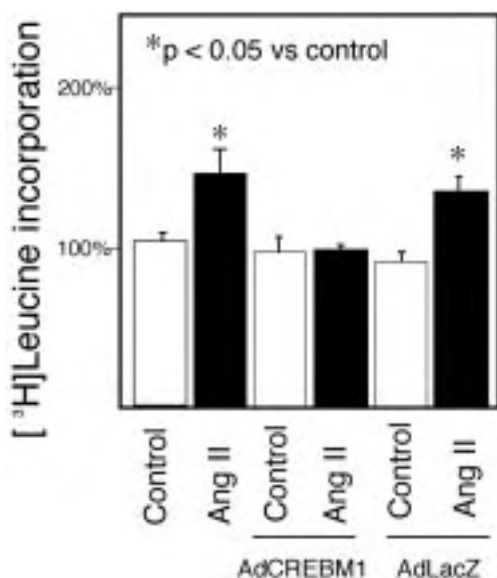


Figure 2 Overexpression of dominant negative CREB (CREBM1) inhibited angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMCs). AdCREBM1 but not AdLacZ inhibited angiotensin II-induced leucine incorporation.

アンジオテンシンIIとTNF α による CREBの活性化

われわれは、血管平滑筋細胞において、アンジオテンシンII(Ang II)によるインターロイキン6遺伝子の発現誘導がプロモーター領域のCREに依存していることを報告した¹²⁾。さらに、Ang IIは5~10分をピークに、濃度依存性にCREBのリン酸化を誘導した。この効果はAng IIタイプ1(AT1)受容体の拮抗剤であるCV11974により阻害されるのでAT1を介した効果と考えられる。Ang IIによるCREBのリン酸化は、PD98059やSB203580によって抑制されることから、 α 1アドレナリン受容体とは異なりAT1受容体の下流では、ERKやp38MAPKの経路がCREB活性化に重要と考えられる。アデノウイルスベクターを用いてドミナントネガティブCREBを血管平滑筋細胞に過剰発現させるとAng IIによる肥大(ロイシンの取り込み)がほぼ完全に抑制された(Fig. 2)。

また、トロンビン¹³⁾やprostaglandin F 2α ¹⁴⁾も血管平滑筋細胞においてCREBを活性化することがわかった。トロンビンとprostaglandin F 2α によるCREBの活性化

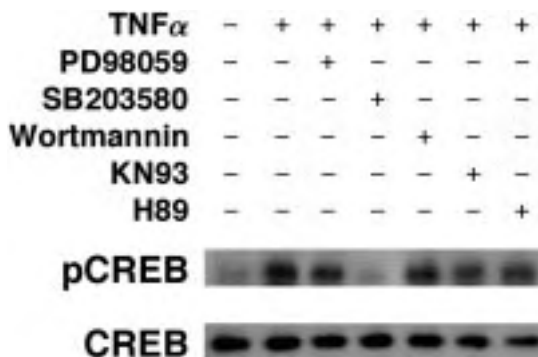


Figure 3 SB203580 inhibited TNF α -induced CREB phosphorylation.

Among the several protein kinase inhibitors tested, only SB203580, an inhibitor of p38MAPK, inhibited TNF α -induced CREB phosphorylation examined by Western blot analysis.

も、PD98059とSB203580によって抑制された。したがって、Gqにカップルする7回膜貫通型の受容体は、主にERKとp38MAPKを介してCREBを活性化することが示唆された。

これに対して、TNF α は、ERKとp38MAPKをとともに活性化するにもかかわらず、SB203580のみがTNF α によるCREBのリン酸化を抑制した(Fig. 3)¹⁵⁾。したがって、p38MAPKがTNF α によるCREBのリン酸化に重要な役割を果たすと考えられる。われわれが用いたラット大動脈由来の培養血管平滑筋細胞において、TNF α は細胞増殖やアポトーシスを誘導しなかったが、細胞遊走を誘導することがわかった。ドミナントネガティブCREBの過剰発現は、TNF α による細胞遊走を抑制した(Fig. 4)。さらにSB203580やドミナントネガティブRac1の過剰発現も同様にTNF α による血管平滑筋細胞の遊走を抑制した。したがって、TNF α はp38MAPK-CREB-Rac1の経路を介して血管平滑筋細胞の遊走を制御することが示唆された。血管内皮細胞においては、TNF α がp38MAPK-CREBの経路を介して細胞接着因子であるVCAM1の発現を制御することを報告している¹⁶⁾。

最近、脳下垂体由来のGH4C1細胞において、フォールスコリンにより誘導されるCREBのリン酸化が甲状腺ホルモンによって阻害されることが報告された¹⁷⁾。これは、甲状腺ホルモンによって活性化された甲状腺ホルモン受容体がCREBと蛋白-蛋白相互作用を介してCREBのリン酸化が阻害されると考えられている。わ

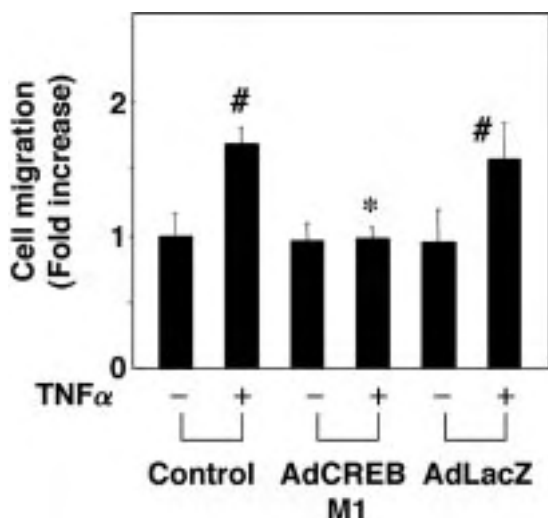


Figure 4 Overexpression of dominant negative CREB (CREBM1) inhibited TNF α -induced migration of VSMCs. AdCREBM1 but not AdLacZ inhibited TNF α -induced migration of VSMCs examined by Boyden Chamber method. # $p < 0.05$ vs TNF α (-), * $p < 0.05$ vs TNF α (+) in control cells

れわれも、Ang IIによるCREBリン酸化に対する甲状腺ホルモンの効果を検討したところ、以前の報告と同様にCREBのリン酸化が抑制された¹⁸⁾。したがって、甲状腺ホルモンは内因性にCREBの機能を抑制する重要な因子と考えられる。甲状腺機能低下は動脈硬化の危険因子の一つとされている。甲状腺ホルモンによるCREB活性化の障害は、甲状腺ホルモンが抗動脈硬化的に作用する機序に関与する可能性も考えられる。

おわりに

CREB依存性の遺伝子発現は血管平滑筋細胞の増殖や肥大に重要な役割を担うことが示唆された。また、これらの結果からCREBには交感神経系、レニン・アンジオテンシン系、凝固系さらにサイトカインなどからのシグナルが収束し、CREBはそのシグナルを遺伝子発現へと変換する重要な転写因子と考えられる。血管局所におけるCREB機能を抑制することが、動脈硬化症などの画期的治療方法となる可能性があると考えられる。

文 献

1) Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA et al: Identifica-

tion of a cyclic-AMP- responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**: 6682–6686.

- 2) Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH et al: Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 1988, **334**: 494–498.
- 3) Gonzalez GA, Montminy MR: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 1989, **59**: 675–680.
- 4) Xing J, Ginty DD, Greenberg ME: Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 1996, **273**: 959–963.
- 5) Tan Y, Rouse J, Zhang A et al: FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J*, 1996, **15**: 4629–4642.
- 6) Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME: CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 1991, **252**: 1427–1430.
- 7) Du K, Montminy M: CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 32377–32379.
- 8) Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM et al: Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 2415–2426.
- 9) Williams SD, Ford DA: Calcium-independent phospholipase A(2) mediates CREB phosphorylation and c-fos expression during ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **281**: H168–H176.
- 10) Lin RZ, Chen J, Hu ZW et al: Phosphorylation of the cAMP response element-binding protein and activation of transcription by α 1 adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 30033–30038.
- 11) Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R et al: Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 25184–25189.
- 12) Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K et al: Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1999, **34**: 118–125.
- 13) Tokunou T, Ichiki T, Takeda K et al: cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1764–1769.

- 14) Fukuyama K, Ichiki T, Ono H et al: cAMP-response element-binding protein mediates prostaglandin F₂ α -induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**: 910–918.
- 15) Ono H, Ichiki T, Fukuyama K et al: cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor- α -induced vascular smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 1634–1639.
- 16) Ono H, Ichiki T, Ohtsubo H et al: cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor- α -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Hypertens Res*, 2006, **29**: 39–47.
- 17) Méndez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A, Aranda A: The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J*, 2003, **22**: 3102–3112.
- 18) Fukuyama K, Ichiki T, Imayama I et al: Thyroid hormone inhibits vascular remodeling through suppression of cAMP response element binding protein activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**: 2049–2055.

Critical Role of cAMP Response Element Binding Protein in the Signaling of Angiotensin II and Tumor Necrosis Factor α

Toshihiro Ichiki

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Key words: angiotensin II, tumor necrosis factor α , cAMP response element binding protein, thyroid hormone, mitogen-activated protein kinase

Although cyclic AMP response element binding protein (CREB) plays an important role in the survival of neuronal cells and T lymphocytes, the role of CREB in vascular smooth muscle cells (VSMC) remains unclear. We examined the activation and the role of CREB in VSMC. Angiotensin II as well as thrombin and prostaglandin F₂ α activated CREB through ERK and p38MAPK pathway. These data suggest that G-protein-coupled receptors coupled to G_q activate CREB through ERK and p38MAPK. In contrast, TNF α -induced CREB phosphorylation was dependent on p38MAPK. Overexpression of dominant negative form of CREB by an adenovirus vector suppressed angiotensin II-induced incorporation of [³H]-leucine to VSMC and neointimal formation by balloon injury of rat carotid artery. Overexpression of dominant negative CREB suppressed TNF α -induced migration of VSMCs and expression of VCAM1 in endothelial cells. These findings suggest that CREB is a transcription factor activated by several different extracellular stimuli through different pathways and plays an important role in the regulation of the function of VSMC and endothelial cells, which may be involved in the vascular remodeling process.

(J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 377–381)