アラキドン酸によるモルモット大動脈培養 平滑筋細胞の増殖制御*

森 崎 信 尋**

吉 田

尚**

David G. CORNWELL***

I. 序 論

動脈壁平滑筋細胞 (SMC) の増殖が動脈硬化症の進展に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし SMC 増殖のメカニズムについての詳細は明かではない。高脂血症血清より得られた低比重リポタンパク¹⁾ や血小板より放出される因子 (platelet derived growth factor)²⁾ などが SMC の増殖を促進することが知られている。

動脈壁細胞はリン脂質 (PL)・中性脂肪 (TG)・コレステロールエステル (CE) 等の複合脂質を含む。それらはいろいろな種類の脂肪酸より構成されている。正常な動脈壁ではこれらのうち PL が最も多い。PL は主として 16:0・18:0 の飽和脂肪酸、18:1 (n-9) のモノエン脂肪酸、18:2 (n-6)・20:4 (n-6) [アラキドン酸 (AA)] の多価不飽和脂肪酸により構成されている。しかし動脈硬化巣では CE が著増し多量の脂肪酸を含むようになる。Fatty streak では 18:1 (n-9) 以外に 20:3 (n-6)・22:4 (n-6) をも多く含む CE がみられるようになる³⁾。AA も CE に含まれ相対量が変化しない場合でも CE の絶対量が著増するので CE 中の AA の絶対量も増加すると考えられる。一方 PL 中の AA の相対量は低下する³⁾。AA は PL 中のものが最も利用可能であるとすれば、硬化巣では AA が利用されにくいことが推測される。

AA は必須脂肪酸の一つであり動物の成長に必要である。AA は cyclooxygenase によって種々の prostanoids (prostaglandin とその関連物質) 産生

の基質となる。prostanoids は種々の組織で細胞増殖に影響する^{4,5)}。また AA は多価不飽和脂肪酸の一つとして acyclic lipid peroxidation による lipid peroxides 産生の基質ともなる。増殖の著しい組織では lipid peroxides が低いことが報告されている⁵⁾。以上の事実は AA が細胞増殖に影響することを示唆している。そこでわれわれは AA の SMC 増殖に対する影響とそのメカニズムを培養モルモット SMC を使用して検討したので報告する。

II. 研究方法

1. 材 料

薬剤は次の会社より購入または供与された。AA, Nuchek 社 (Elysian, MN); indomethacin・hydralazine・nordihydroguaiaretic acid・ α -naphthol・propyl gallate, Sigma (St. Louis, MI); Vitamin E・Vitamin E quinone (EQ), Eastman Organic Chemicals (Rochester, NY); 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), Aldorich Chemical Co. (Milwaukee, WI); dipyrindamole, Boehringer Ingelheim Ltd. (Ridge field, Conn.). AA は 99% 以上の純度であり、lipid peroxides を含まないことを確認した⁶⁾ のもののみ使用した。

2. 細胞培養

モルモット胸部大動脈よりすでに報告した方法⁷⁾ で SMC を培養した。

3. Prostanoids および lipid peroxides 合成

AA および他の薬剤は 95% EtOH に溶解し、対照および実験群の EtOH 濃度が 0.2% 以下になるように添加した。これら薬剤を confluent SMC に 4 ml/media (20% fetal bovine serum)⁷⁾ と 24 hr インキュベートし、media は radioimmunoassay⁸⁾

* 1983 年 12 月, 日本動脈硬化学会 昭和 58 年度冬季大会において発表

** 千葉大学医学部第二内科

*** オハイオ州立大学生理生化学部

Fig. 1 Formation of 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, and lipid peroxides (MDA) when confluent smooth muscle cells were incubated for 24 hrs. with different concentrations of AA.

Fig. 2 Effects of AA on the proliferation of SMC.

によって PGI₂ (6-keto-PGF_{1α})・PGE₂ の測定に、細胞は TBA-RS 法により^{8,9)} lipid peroxide(s) を測定し、MDA 当量として表現した。Prostanoids は media 中に、lipid peroxides は cell 中にそれぞれ 90% 以上存在することが確認された。この SMC の産生する prostanoids は主として PGI₂・PGE₂ で

Fig. 3 Effects of 10 μM indomethacin (Im) on cell proliferation of SMC. Each group contained 8 plates. Data are expressed as relative cell number compared to control (media alone). Vertical lines show SEM. The group with 10 μM AA was significantly higher ($p < 0.05$) than control.

あることも確認されている。実験法の詳細は他の論文で報告した⁸⁾。

4. 細胞増殖

すでに報告した方法^{8,9)}で行った。

III. 結 果

1. Prostanoids および lipid peroxides 産生への AA の効果：Fig. 1 のごとく AA の量に依存して prostanoids・lipid peroxide(s) の産生が confluent SMC で上昇した。

2. 細胞増殖への AA の効果：Fig. 2 のごとく 16 μM までの AA により SMC の細胞増殖が促進された。30 μM 以上の AA により増殖は抑制された。

3. Indomethacin の効果：Fig. 3 のごとく 10 μM の indomethacin (この濃度で prostanoids は 95% 以上抑制される) は対照に添加しても SMC 増殖に影響はないが、10 μM の AA によって促

Fig. 4 Effects of hydralazine on the formation of prostanooids in confluent SMC for 24 hrs. with different concentrations of the drug.

進された細胞増殖を抑制した。

4. Hydralazine の prostanooids 産生・細胞増殖への影響：Fig. 4 のごとく，hydralazine は confluent の細胞中で dose に依存して prostanooids 産生を促進した。Fig. 5 のごとく 10 μM の hydralazine は細胞増殖を促進し，indomethacin はそれを抑制した。

5. Antioxidants の lipid peroxide(s) 産生への影響：種々の antioxidants は confluent SMC 中の AA よりの lipid peroxide(s) 産生を強力に抑制した (Table 1)。

6. 高濃度の AA による細胞増殖抑制効果への antioxidants の影響：高濃度 (60 μM–120 μM) の AA は Fig. 2 のごとく細胞増殖を抑制するが，Table 1 の antioxidants はすべてこれを回復した (Table 2)。antioxidants の濃度は confluent の状態と比べ低濃度が至適であった。

IV. 考 察

低濃度の AA の効果は Fig. 2～Fig. 5 より AA より産生される prostanooids または産生過程そのものの効果であることが推測される。生理的用量

(Im : indomethacin, Hy. : hydralazine)

Fig. 5 Effects of 10 μM hydralazine (Hy.) and 10 μM indomethacin (Im) on the proliferation of SMC. Each group contained 8 plates. Data are expressed as relative cell number compared to control (media alone). Vertical lines show SEM. The group with 10 μM hydralazine was significantly higher ($p < 0.05$) than control.

Table 1 Inhibition of MDA formation by antioxidants

Treatment	MDA
120 μM arachidonic acid	100%
+ 50 μM VitE	4%
+ 10 μM VitEQ	16%
+ 100 μM Nordihydroguaiaretic acid	17%
+ 200 μM α-Naphthol	23%
+ 200 μM Propyl gallate	48%
+ 100 μM BHT	18%
+ 100 μM Dipyrindamole	23%

Table 2 Effect of antioxidants on SMC proliferation inhibited by high dose of arachidonic acid

Treatment	Cell proliferation
60–120 μM arachidonic acid	100%
+ 1 μM VitE	258%
+ 1 μM VitEQ	212%
+ 0.5 μM Nordihydroguaiaretic acid	225%
+ 5 μM α-Naphthol	179%
+ 0.1 μM Propyl gallate	223%
+ 1 μM Dipyrindamole	260%

の PGE_2 が SMC の増殖を促進することはすでに報告した¹⁰⁾.

高濃度の AA の細胞増殖抑制効果は AA より産生される acyclic lipid peroxide(s) または lipid peroxidation の過程そのものの効果であることが、Tables 1, 2 より推測される. 高濃度の PGE_2 は SMC の増殖を抑制するが^{6,10)}, indomethacin は antioxidants のような増殖回復効果は示さない¹⁰⁾ ので, AA を増加させても増殖を抑制させるに至るほどの PGE_2 は産生されないと考えられる.

以上の細胞増殖に対する AA の複雑な作用が in vivo でどのように働くかは今後の検討を要するが, 例えば, 増殖を抑制する量の AA が生理的に存在するとすれば, 硬化巣で PL 中の AA が低下することは細胞増殖を促進させる可能性がある. また増殖を抑制する acyclic lipid peroxidation pathway を block しすぎるとかえって増殖を促進し動脈硬化を悪化させる危険がある. Dipyridamole は血管壁での PGI_2 産生を促進する薬物として知られているが, その限りでは血小板の凝集・附着を防ぐことによって動脈硬化を退縮させることが推測される. しかし 3 施設よりの報告では動脈硬化を促進している¹¹⁻¹⁴⁾. SMC の増殖像が特に著明であった. Table 1, Table 2 にこの薬剤が他の antioxidants と同様の作用のあることが示してある. 本研究で示された acyclic lipid peroxidation に対する dipyridamole の効果が in vivo でこの薬剤のパラドキシカルな作用を説明する一助となる¹⁵⁾. これらの事実は本研究での in vitro の成績が in vivo でも働いていることを示唆する.

今回 TBA-RS 法で測定した lipid peroxidation の pathway の性格および代謝産物の同定は現在進行中である. いずれにしても近年生理的役割を持つ cyclooxygenase・lipoxygenase のように lipid peroxidation を含む pathway の概念が確立されてきており, lipid peroxidation を細胞(膜)障害とのみ結びつけることの反省が必要と考える. 今後, よく制御された lipid peroxidation の役割が解明されることを期待したい.

文 献

1) Fischer-Dzoga, K., Fraser, R. and Wissler, R. W.:

- Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells. I. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. *Exp. Mol. Pathol.*, **24**: 346-359 (1976).
- 2) Ross, R., Glomset, J. A., Kariya, B. and Harker, L.: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 1207-1210 (1974).
- 3) Cornwell, D. G., Geer, J. C. and Panganamala, R. V.: Development of atheroma and the lipid composition of the deposit in "Pharmacology of lipid transport and atherosclerotic processes". Masoro, E.J., IEPT section 24, pp. 445-483, Pergamon Press, New York (1975).
- 4) Honn, K. V., Bockman, R. S. and Marnett, L. J.: Prostaglandins and cancer: A review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins*, **21**: 833-864 (1981).
- 5) Cornwell, D. G. and Morisaki, N.: Fatty acid paradoxes in the control of cell proliferation: prostaglandins, lipid peroxides and co-oxidation reactions in "Free Radicals in Biology" Pryor, W.A. ed., Vol. VI, pp. 95-148, Academic Press, New York.
- 6) Huttner, J. J., Gwebu, E. T., Panganamala, R. V., Milo, G. E., Cornwell, D. G., Sharma, H. M. and Geer, J. C.: Fatty acids and their prostaglandin derivatives: inhibitors of proliferation in aorta smooth muscle cells. *Science*, **197**: 289-291 (1977).
- 7) Huttner, J. J., Cornwell, D. G. and Milo, G. E.: Preparation of primary cultures of smooth muscle cells from prepubertal guinea-pig aortas. *T.C.A. Manual*, **3**: 633-639 (1977).
- 8) Morisaki, N., Sprecker, H., Milo, G. E. and Cornwell, D. G.: Fatty acid specificity in the inhibition of cell proliferation and its relationship to lipid peroxidation and prostaglandin biosynthesis. *Lipids*, **17**: 893-899 (1982).
- 9) Gavino, V. C., Miller, J. S., Ikharebha, S. O., Milo, G. E. and Cornwell, D. G.: Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *J. Lipid Res.*, **22**: 763-769 (1981).
- 10) Cornwell, D. G., Huttner, J. J., Milo, G. E., Panganamala, R. V., Sharma, H. M. and Geer, J. C.: Polyunsaturated fatty acids, vitamin E, and the proliferation of aortic smooth muscle cells. *Lipids*, **14**: 194-207 (1979).
- 11) Dembinska-Kièc, A., Rücker, W. and Schönhöfer, P. S.: Effects of dipyridamole in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **33**: 315-327 (1979).
- 12) Dembinska-Kièc, A., Rücker, W. and Schönhöfer, P. S.: Effects of dipyridamole in vivo on ATP and cAMP content in platelets and arterial walls and

- on atherosclerotic plaque formation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **309**: 59-64 (1979).
- 13) Koster, Jr., J. K., Tryka, A. F., H'Doubler, P. and Collins, Jr., J. J.: The effect of low-dose aspirin and dipyridamole upon atherosclerosis in the rabbit. Artery, **9**: 405-413 (1981).
- 14) Hollander, W., Kirkpatrick, B., Paddock, J., Colombo, M., Nagraj, S. and Prusty, S.: Studies on the progression and regression of coronary and peripheral atherosclerosis in the cynomolgus monkey. I. Effects of dipyridamole and aspirin. Exp. Mol. Pathol., **30**: 55-73 (1979).
- 15) Morisaki, N., Stitts, J. M., Bartels-Tomei, L., Milo, G. E., Panganamala, R. V. and Cornwell, D. G.: Dipyridamole: an antioxidant that promotes the proliferation of aorta smooth muscle cells. Artery, **11**: 88-107 (1982).

Summary

Effect of Arachidonic Acid (AA) on the Proliferation of Cultured Guinea Pig Aortic Smooth Muscle Cells (SMC)

Nobuhiro MORISAKI*, Sho YOSHIDA* and David G. CORNWELL**

*The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280, Japan

**Department of Physiological Chemistry, Ohio State University, Columbus, OH 43210, U.S.A.

The role of AA metabolites in SMC proliferation was investigated to clarify the mechanism and regulation of abnormal SMC proliferation associated with atherosclerosis.

SMC was cultured from guinea pig thoracic aorta. 30 to 120 μ M AA was incubated with confluent SMC for 24 hr. SMC synthesized PGI_2 (6-keto- $\text{PGF}\alpha$) and PGE_2 through cyclooxygenase pathway and lipid peroxides through acyclic lipid peroxidation pathway in a dose dependent manner. 1 to 90 μ M AA was incubated with SMC seeded at low density (80/cm²) for 8 days. SMC proliferation was stimulated by 1 to 16 μ M AA (low dose) and inhibited by 30 to 90 μ M AA (high dose). Hydralazine stimulated prostanoid biosynthesis and enhanced the proliferation of SMC as low dose of AA did. 10 μ M indomethacin which inhibited

prostanoid biosynthesis by more than 95% inhibited the proliferation of SMC enhanced by either low dose of AA or 10 μ M hydralazine. This drug had no effect on the proliferation of SMC inhibited by high dose of AA. Various antioxidants inhibited acyclic lipid peroxidation in SMC. The proliferation of SMC which was inhibited by high dose of AA was restored by these antioxidants.

From above results it was suggested that low dose of AA stimulated SMC proliferation through cyclooxygenase pathway and that high dose of AA inhibited SMC proliferation through acyclic lipid peroxidation pathway.

Key words: smooth muscle cell, arachidonic acid, cell proliferation, prostanoid, lipid peroxidation.