SHR 大動脈由来培養平滑筋細胞の 増殖・遊走能に関する研究*

中山 泰一** 内藤 通孝** 浅井 幹一**
葛谷 雅文** 舟木 千明** 葛谷 文男**

I. 緒 言

R. Ross の response to injury hypothesis¹⁾ によれば、高脂血症・高血圧症などによる動脈内皮の傷害が引き金となり、血小板の付着・凝集もしくは脂質を取り込んだマクロファージの動脈壁内浸潤が起これと中膜平滑筋細胞の遊走・増殖が惹起され、また平滑筋細胞内への脂質の沈着といった過程が繰り返されることにより粥状硬化が進展するとされている。

一方、E. W. Sutherland によりその存在が報告²⁾されて以来約 30 年になろうとする cyclic AMP (cAMP) は、ホルモンの細胞内伝達物質として糖・脂質・蛋白質などの種々の物質代謝をコントロールするほか、内分泌および神経機能などにも関与し、Ca²⁺ イオンとともに重要な役割りを果たしていることが明らかにされてきた。

また家兎を用いた実験では、血管傷害および動脈硬化進展に伴う壁内 cAMP 量の低下が報告³⁾されている。そこでわれわれは動脈硬化症の risk factor の一つである高血圧症を遺伝的に自然発症するラット (SHR) を用いて、その大動脈由来平滑筋細胞 (SMC) の増殖・遊走能およびそこにおける cAMP の役割りについて対照の Wistar-Kyoto Rat (WKY) と比較検討した。

II. 材料および方法

実験には 12 週齢の雄性ラットを 1 群 5 匹として供した。収縮期血圧の平均値は SHR が 182.6

mmHg, WKY 128.0 mmHg がであった。SMC は無菌的に摘出した胸部大動脈の中膜より Explant 法により分離・培養したものをを用いた。

細胞増殖能は増殖曲線の作成ならびに対数増殖期における Doubling time (DT) を求めることにより検討した。

遊走能は当教室ですでに報告⁴⁾した方法、すなわち、培養血中で confluent に達した SMC の半分を直径の位置で掻き取り wound edge からの遊走距離を測定した。

III. 結 果

Figure 1 は dibutyryl cAMP (Bt₂ cAMP) 添加時の増殖曲線を、Table 1 は同じく Bt₂ cAMP 添加時の DT を示す。10⁻⁴M の Bt₂ cAMP は SHR および WKY 由来 SMC の DT を有意に延長したが、その影響は SHR の方がより小さかった。

Table 2 は SMC の遊走に対する Bt₂ cAMP の影響を示す。SHR の場合も WKY の場合もほぼ濃度依存的な遊走の抑制が認められた。その抑制は WKY の場合により低濃度で発現した。

Table 3 は cholera toxin (CT) 添加時の DT を示す。SHR および WKY いずれの場合にも 1~1,000 ng/ml の範囲でほぼ用量依存的に有意な DT の延長を認めたが、この場合にも CT の影響は SHR の方がより少ないという結果であった。

IV. 考 察

Figure 1 および Tables 1~3 において示されているように各薬剤無添加の場合、SHR 大動脈由来の SMC は WKY 由来のそれに比べ有意に高い増殖・遊走能を認めた。同様の傾向は他の報告に

* 1986 年 5 月、第 18 回日本動脈硬化学会総会において発表

** 名古屋大学医学部老年科

Fig. 1 Effects of dibutyryl-cAMP on the growth of aortic SMC from SHR and WKY.

Table 1 Effects of dibutyryl-cAMP on the doubling time of aortic SMC from SHR and WKY

Concentration	SHR	WKY
0 M	16.6 ± 0.64 (hrs)	17.6 ± 0.63 (hrs)
10 ⁻⁸ M	15.5 ± 2.42	18.8 ± 1.63
10 ⁻⁷ M	16.5 ± 1.20	17.7 ± 1.47
10 ⁻⁶ M	16.4 ± 1.24	18.7 ± 3.46
10 ⁻⁵ M	16.9 ± 0.87	17.8 ± 1.76
10 ⁻⁴ M	20.3 ± 0.96	27.0 ± 5.30

mean ± s.d. * : P < 0.05, ** : P < 0.01

Table 2 Effects of dibutyryl-cAMP on the migration of aortic SMC from SHR and WKY

Concentration	SHR	WKY
0 (M)	904.5 ± 94.7 (μm)	812.0 ± 78.0 (μm)
10 ⁻⁸	847.0 ± 98.1	713.0 ± 82.8
10 ⁻⁷	851.0 ± 116.7	684.5 ± 122.3
10 ⁻⁶	810.0 ± 101.0	668.6 ± 66.3
10 ⁻⁵	764.5 ± 101.0	736.3 ± 49.4

mean ± s.d. * : p < 0.05, ** : p < 0.01,

Table 3 Effects of cholera toxin on the doubling time of aortic SMC from SHR and WKY

Concentration	SHR	WKY
0 (ng/ml)	17.3 ± 0.96	20.0 ± 1.59
1	20.2 ± 1.71	32.3 ± 6.59
10	21.1 ± 1.82	35.8 ± 9.72
100	21.3 ± 2.47	44.7 ± 7.13
1000	20.9 ± 2.54	69.0 ± 25.18

mean ± s.d. * : p < 0.05, ** : p < 0.01

については種々の細胞を用いて検討されてきている。1968年にBHK-21/13細胞およびHeLa細胞の増殖がTheophyllineあるいはcAMPそのものの添加により抑制されると報告⁷⁾されて以来、3T3細胞あるいはneoplastic L strain細胞といった齧歯類由来線維芽細胞の株細胞などにおいてcAMPによる増殖抑制が観察されてきた。ところが1970年代後半になるとヒト表皮角化細胞⁸⁾などの上皮・内皮細胞を用いた研究においてcAMPが増殖促進的に作用することが示されてきた。

われわれの今回の検討では、ラット大動脈由来の培養SMCにおいてcAMPがnegative regulatorとして作用していると考えられる結果を得た。またBt₂cAMPおよびCTによるSMCの増殖・遊走抑制に対してSHR大動脈由来の細胞が抵抗性を示したことは、SHRSMCの細胞膜もしくは細

においても認められていることから、高血圧症が動脈硬化症のrisk factorとして重要な意味を持つものと思われる。

細胞の増殖・分化におけるcAMPの役割りに

胞膜 cAMP 系のいずれかの部位に異常を有していることを示唆するものと考えられた。

文 献

- 1) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis-An update. *New Eng. J. Med.*, **314**: 488-500 (1986).
- 2) Sutherland, E. W., et al.: The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{2+} and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 3608 (1957).
- 3) Numano, F., et al.: Changes of cyclic AMP and cyclic AMP Phosphodiesterase in the progression and regression of experimental atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **275**: 311-320 (1976).
- 4) Naito, M., et al.: Vascular endothelial and smooth muscle cell migration. *J. Jpn. Atheroscler. Soc.*, **13**: 1177-1178 (1985).
- 5) Yamori, Y., et al.: Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.*, **61** (Suppl. 7): 121s-123s (1981).
- 6) Haudenschild, C. C., et al.: Effects of Hypertension on migration and proliferation of smooth muscle in culture. *Hypertension*, **7** (Suppl. I): I101-I104 (1985).
- 7) Bürk, R. R.: Reduced adenyl cyclase activity in a polyoma virus transformed cell line. *Nature*, **219**: 1272-1275 (1968).
- 8) Gilman, A. G.: G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, **36**: 577-579 (1984).

Summary

The Proliferation and the Migration of Aortic Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats

Yasukazu NAKAYAMA, Michitaka NAITO, Kanichi ASAI, Masafumi KUZUYA,
Chiaki FUNAKI and Fumio KUZUYA

Department of Geriatrics, Nagoya University School of Medicine

We investigated the proliferation and the migration of aortic smooth muscle cells (SMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY) in culture. The doubling time of SMC was significantly elongated by dibutyl-cAMP (Bt₂ cAMP) and cholera toxin (CT) and the migration of SMC was also inhibited by the former. The suppression of the proliferation and the migration of SHR-SMC caused by Bt₂ cAMP

and CT wasn't so clear comparing with SMC from WKY. These results suggest that cAMP is a negative regulator in the proliferation of rat aortic SMC, and there are some differences between SMC from SHR and WKY in their membrane and/or cAMP second messenger system.

Key words: Spontaneously hypertensive rat (SHR), Smooth muscle cell (SMC), cAMP, Cholera toxin, Proliferation.