ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生に及ぼす
アンギオテンシン変換酵素関連物質の影響
—— 単離血管との比較 ——

沢田 昌平* 高松 一* 前防 則彦* 豊田 武夫*
辻 肇* 林 謙宏* 中川 雅夫* 伊地知浜夫*

Relationship between PGI_2 generation and angiotensin
I-converting enzyme related substances in cultured
human vascular endothelial cells and aortic rings

Shohei SAWADA*, Hajime TAKAMATSU*, Norihiko MAEBO*,
Takeo TOYODA*, Hajime TSUJI*, Kenhiro RIN*,
Masao NAKAGAWA* and Namao IJICHI*

Key word: endothelial cells, prostacyclin,
ACE, angiotensin II, bradykinin

The effects of angiotensin I (AI) -converting enzyme (ACE) linked substances upon PGI_2 generation were investigated using cultured human vascular endothelial cells and rat aortic rings.

Endothelial cells were obtained from human umbilical cord vein and cultured by the modified method of Jaffe et al. PGI_2 level was measured by radioimmunoassay of its stable metabolite 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, and ACE activity was assayed by Lieberman's method.

In the endothelial cells, addition of AI or bradykinin (BK) enhanced PGI_2 generation and also increased ACE activity in the culture medium, but angiotensin II (AII) did not show any effect. Captopril inhibited both of PGI_2 generation and ACE activity in a dose dependent manner, but the enhancement of PGI_2 generation by AI or BK was not affected by the pretreatment with captopril. Meanwhile in the rat aortic rings, AI, AII, and BK enhanced PGI_2 generation but captopril decreased PGI_2 generation in its higher concentration (10^{-3} M), and at the same time mechanical stimulation enhanced PGI_2 generation. But in the aortic rings whose endothelium was rubbed with blade, PGI_2 generation and AII induced PGI_2

* 京都府立医科大学第二内科〔〒602 京都市上京区河原町通り広小路上ル〕 The Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

enhancement remarkably decreased.

Through these results it was suggested that conversion of AI to AII by ACE was suspected not to cause the enhancement of PGI₂ generation in the endothelial cells, and that the enhanced PGI₂ generation of aortic rings by AII was considered to be due to interaction of smooth muscle cells and endothelial cells. The previously reported hypothesis that captopril enhanced PGI₂ generation by the accumulation of AI or BK via ACE inhibition, was not confirmed in this experimental system, and captopril was proved to inhibit PGI₂ generation directly. It was rather suggested that the enhanced PGI₂ generation in the endothelial cells by AI or BK was probably controlled by their ACE activation, as an autoregulation mechanism.

はじめに

生体の血圧維持機構においては、交感神経系, renin-angiotensin (以下 RA) 系, kallikrein-kinin (KK) 系, ならびに prostaglandin (PG) 系などが相互に関与していると考えられ従来より種々の脈管作動物質の作用機序における上記諸物質の関与が検討されてきているが, その作用機序における PGI₂ 産生亢進作用の関与の有無は実験系あるいは種属の差異により結果が一致しないものもあり, 一定の結論に至っていないのが現状である。

Moncada らは血管壁の PGI₂ 産生の主座としての内皮細胞の重要性を報告している¹⁾ が一方 acetylcholine, bradykinin (BK), calcium ionophore などの脈管作動物質による単離血管の弛緩反応においては血管内皮細胞の存在が必要であることが報告されており²⁾, また Furchgott³⁾ は血管弛緩作用を示す endothelium derived relaxing factor の内皮での存在を示唆している。このように血管壁の弛緩反応における内皮細胞の重要性及び血管内皮と平滑筋の相互作用の重要性が近年注目されており血管壁の PGI₂ 産生を検討する際に, 内皮細胞と単離血管との PGI₂ 産生を比較検討することは有意義であると考えられる。

そこで今回われわれは血管壁 PGI₂ 産生に及ぼす BK, angiotensin I (AI), angiotensin II (AII) ならびに captopril などのアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 関連物質の影響について ACE 活性を含めて, ヒト臍帯静脈培養内皮細胞

およびラット胸部大動脈輪を用いて比較検討し, 若干の考察を加えた。

I. 方 法

1. 血管内皮細胞培養法とその同定

ヒト臍帯静脈内皮細胞は既報⁴⁾の方法により培養し, confluent 形成した初代培養細胞を以下の実験に供した。なお細胞質に Weibel-Palade body の存在を確認することにより内皮細胞と同定した。

2. PGI₂ 並びに ACE 活性の測定法

PGI₂ 量は New England Nuclear 社製 6-keto PGF_{1α} [³H] RIA kit⁵⁾ を使用し 6-keto PGF_{1α} 量として測定し, ACE 活性は Lieberman⁶⁾の方法に準じて測定した。

3. 内皮細胞の PGI₂ 産生ならびに保生液中の ACE 活性の経時的变化の検討法

confluent 形成した初代培養細胞を Buffer A (150mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH 7.4) にて 2 回洗浄後, Buffer A 500 μl を添加し, 37°C で保生し, 保生液中に産生遊離される PGI₂ 量ならびに ACE 活性を測定し, その経時的变化を検討した。

4. 内皮細胞の PGI₂ 産生, 並びに保生液中の ACE 活性に及ぼす脈管作動物質の影響の検討

内皮細胞の保生系に captopril (10⁻³~10⁻⁹M), BK (Sigma) (10⁻⁶, 10⁻⁸M), AI (Sigma) (10⁻⁶, 10⁻⁸M) および AII (Sigma) (10⁻⁴, 10⁻⁶M) を添加後, 同様に保生し PGI₂ 量ならびに ACE

Fig. 1a, 1b ACE activity and PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells

活性を測定した。

5. 内皮細胞の PGI₂ 産生に及ぼす captopril 前処置の影響の検討法

内皮細胞を captopril (10⁻⁵ M) にて30分間前処置後, Buffer A にて2回洗浄し, BK あるいは AI (10⁻⁶ M) を添加後一定時間保生し, 保生液中の PGI₂ 量を測定した。

6. 大動脈ならびに内膜剝離大動脈輪の作成, 保生法

胸部大動脈は体重 200—300 g の Wister 系雄性ラットよりエーテル麻酔下に摘出し 4~5mm に細切し, 氷冷生理食塩水中で軽く洗浄後, 湿重量 2 mg あたり 1 ml の Buffer A を加え 10 分間 37°C で保生した。大動脈輪を除去後 1 mM aspirin を 100 μl/1 ml の割合で保生液に添加し, 1500 G, 15 分間の遠心上清を凍結保存後 PGI₂ 量を測定した。

前述の如くラット大動脈を摘出後切開し, blade にて内膜を鈍的に擦過剝離することにより内膜を剝離した大動脈輪を作成し, 同様の保生実験に供した。

7. 大動脈輪の PGI₂ 産生に及ぼす脈管作動物質の影響の検討法

大動脈輪の保生液に captopril (10⁻³~10⁻⁹ M), BK (10⁻⁶, 10⁻⁸ M), AI (10⁻⁶, 10⁻⁸ M) および AII (10⁻⁶, 10⁻⁸ M) を添加後, 同様に保生し PGI₂ 量を測定した。

8. 大動脈輪の PGI₂ 産生に及ぼす機械的刺激の影響の検討法

大動脈輪に 3 回/秒の機械的振盪 (Taiyo Incubator M-100T) を 10 分間加えた場合の PGI₂ 量を測定した。

9. 大動脈輪の PGI₂ 産生に及ぼす内膜と平滑筋の相互作用の検討法

大動脈輪の内膜存在下ならびに非存在下における, Buffer A のみの添加時ならびに AII (10⁻⁶ M) 添加時の PGI₂ 量を測定し比較検討した。

II. 成績

A. 培養内皮細胞における成績

1. PGI₂ 産生ならびに ACE 活性の経時的变化

内皮細胞保生液中の ACE 活性は Buffer A のみの添加時には, 保生開始 15 分後に出現しその後経時的に増大し, 30 分後にはほぼプラトーに達した (図 1a)。また保生液中の PGI₂ 産生量は, 保生開始後急増し, 15—20 分後にはほぼプラトーに達した (図 1b)。すなわち保生液中の ACE 活性の増大は PGI₂ 産生のそれよりやや遅れることが示された。なお以後の実験において ACE 活性ならびに PGI₂ 産生量は保生開始後 30 分の時点で比較した。

2. PGI₂ 産生, 並びに ACE 活性に及ぼす

Fig. 2a, 2b Effect of captopril on ACE activity and PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells

Fig. 3a, 3b Effect of bradykinin (BK) or angiotensin I (AI) on ACE activity and PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells

脈管作動物質の影響

a. Captopril

captopril は ACE 活性を濃度依存性に抑制し、10⁻⁵ M 以上の濃度ではほぼ完全に抑制した (図 2 a)。一方 PGI₂ 産生を濃度依存性に抑制した (図 2 b)。

b. BK および AI

BK または AI はそれぞれ ACE 活性を増大させ (図 3 a)、一方 PGI₂ 産生量も BK または AI の添加濃度依存性に有意に増量させた (図 3 b)。

c. AII

AII は ACE 活性並びに PGI₂ 産生量には影

響を及ぼさなかった (図 4 a, 4 b)。

3. BK および AI による PGI₂ 産生亢進作用に及ぼす captopril 前処置の影響

captopril 前処置下では BK による PGI₂ の産生は量としては著減したが、BK による PGI₂ 産生の促進作用は同様に認められ、その増加率は captopril 非添加時と有意差を認めなかった (表 1)。

保生系への AI の添加による PGI₂ 産生増大率は BK の場合と同様 captopril の存否により影響されなかった (表 1)。

B. 大動脈輪における成績

1. PGI₂ 産生に及ぼす脈管作動物質の影響

Fig. 4a, 4b Effect of angiotensin II (AII) on ACE activity and PGI_2 generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells

Table 1 Effect of pretreatment with captopril on enhanced PGI_2 generation induced by bradykinin (BK) or angiotensin I (AI) in the medium of cultured human vascular endothelial cells

Pretreatment with captopril (10^{-5} M, 30 min)	6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (ng/ml / 2×10^5 cells)		
	control	BK	AI
non-treated	16.11 ± 0.64 (100%)	70.33 ± 0.76 (432 $\pm$ 21%)	46.32 ± 0.33 (288 $\pm$ 20%)
treated	4.84 ± 0.14 (100%)	21.55 ± 0.85 (484 $\pm$ 31%)	14.28 ± 0.76 (321 $\pm$ 26%)

** $p < 0.001$, Mean $\pm$ SE, n = 6

a. Captopril

10^{-5} M 以下の低濃度の captopril では大動脈の PGI_2 産生に影響しなかったが、 10^{-3} M の高濃度では減少した。

b. AI, AII および BK

AI, AII および BK は濃度依存性に大動脈の PGI_2 産生を増大させた (図 5)。

2. PGI_2 産生に及ぼす機械的刺激の影響

大動脈への毎秒 3 回の機械的振盪は PGI_2 産生を著増させた (図 5)。

3. PGI_2 産生に及ぼす内膜と平滑筋の相互作用

大動脈の内膜を剝離した場合には PGI_2 の基

礎産生は減少したが、一方 AII 添加による PGI_2 産生増大作用も内膜剝離により著減した (表 2)。

III. 考 案

Moncada, Vane ら¹⁾による PGI_2 の発見以来、血管拡張作用などの生理活性が明らかにされ、vascular homeostasis の維持機構におけるこの重要性が確認されている。一方従来より血管壁の PGI_2 産生を亢進させると考えられている BK および AII 等の血中濃度は ACE 活性の増減により調節されているので、これらをも含めた ACE 関連物質による PGI_2 の産生遊離

Fig. 5 Effect of captopril, angiotensin I, II (AI, AII), bradykinin (BK) or mechanical stimulation on PGI₂ generation in rat aortic rings

機構は ACE 活性の変動により修飾をうけるものと推測され、この観点から内皮細胞での PGI₂ の産生遊離機構を検討することが望ましいと考えられる。しかるに本実験では、培養内皮細胞の保生液中に ACE 活性を認め、しかも captopril によりこれが抑制されることが確認されたのでヒト臍帯静脈の内皮細胞も ACE の産生母地の一つであると考えられた。従って ACE 関連物質の PGI₂

の産生に及ぼす影響を ACE 活性をも含めて細胞レベルで検討しうる単離培養血管内皮細胞を用いた実験系は有用と考えられる。

しかし、生体内での種々の脈管作動物質による様々な生理活性の発現は overall としての反応であり、この意味において血管壁の PGI₂ 産生遊離機構を whole vessel (大動脈輪) のレベルで総合的に評価することも重要であり、ラット大動脈輪を用いた実験系と培養内皮細胞を用いた実験系におけるこれらの脈管作動物質の作用態度を比較検討することは血管壁の主な構成細胞である内皮細胞と平滑筋細胞との相互関係を知る上で有意義と考えられる。

ヒト臍帯静脈内皮細胞およびラット大動脈輪において、BK 並びに AI はともに PGI₂ 産生を増大させたが、BK の PGI₂ 産生亢進作用については内皮細胞および単離血管においても既

Table 2 Role of endothelium in the PGI₂ generation by AII in rat aortic rings

	Endothelium (+)	Endothelium (-)
Buffer A	100	63.6 ± 4.3
	p < 0.001	p < 0.05
AII (10 ⁻⁶ M)	313.0 ± 32.1	91.4 ± 10.5
	p < 0.001	

(% change, Mean ± SE, n = 6)

に報告されており⁷⁾ 本成績もこれを支持すると考えられる。しかし AI の PGI₂ 産生亢進作用は、従来は AI から AII への変換により生ずるとされているが、内皮細胞においては AII の PGI₂ 産生亢進作用が認められなかったことより、AI から AII への変換を介するものではなく、AI 自体の内皮細胞に対する直接的な刺激作用によるものと推測されたが、その詳細なメカニズムは不明である。

従来 captopril の降圧機序における PGI₂ 産生亢進作用の関与については多くの報告がなされているが、近年 Cinotti ら⁸⁾ は captopril 経口投与後の尿中 PG を測定する場合には、種差、日内変動、精腺、年齢のマッチング等がなければその data には信頼性がないことを報告しており、それ以前の captopril の経口投与後に尿中 PG が増加するとの報告にはこれらの配慮が

Fig. 6 Role of endothelium in the PGI_2 generation by AII in rat aortic rings

乏しいとしているため、われわれは種差以外の上記諸因子の関与が乏しいと考えられる内皮細胞ならびに大動脈輪を用いて検討した。

従来より captopril の降圧機序には BK の蓄積に基づく PGI_2 産生亢進作用の関与が報告されている⁹⁾ので、内皮細胞において検討したところ、captopril 前処置時には BK による PGI_2 の産生量は著減したが、BK による PGI_2 産生の促進作用は認められ、その増加率は captopril 非添加時と差を認めなかったため、captopril の降圧機序の一つとして ACE の阻害に基づく、BK の蓄積を介する PGI_2 産生の増大による機序は否定的と考えられた。

また本実験系では BK のみならず AI によっても PGI_2 産生は亢進したので、captopril 添加による AI の蓄積を介する PGI_2 産生亢進作用の発現が生じるかどうかを検討したところ、保生系への AI の添加による PGI_2 産生増大率は BK の場合と同様 captopril の存否により影響されなかったため、captopril 添加による AI の蓄積を介する PGI_2 産生亢進作用の発現は否定的と考えられた。

また、captopril は内皮細胞および大動脈輪の PGI_2 産生を増大させず、前者ではむしろ著明に抑制した。さらに内皮細胞では captopril 前処置により、BK 及び AI による PGI_2 産生の増大効果が認められなかったことより、captopril の降圧機序の一つとして ACE の阻害に基づく、BK および AI の蓄積を介する PGI_2 産

生の増大による機序は否定的と考えられ、むしろ captopril は PGI_2 産生を直接抑制することが示唆された。Vio ら¹⁰⁾はラット大動脈を用いて captopril が PGI_2 産生を抑制することを報告しており、また Lijnen ら¹¹⁾も高血圧患者に captopril を経口投与したところ、PG が低下したことを報告しているが本成績はこれを支持する。また BK あるいは AI は PGI_2 産生を増加せしめると伴に ACE 活性の増加を惹起させるので、この活性増大は PGI_2 産生増大の促進因子としての BK および AI の減少を招くことになり、 PGI_2 の産生調節因子として BK, AI および ACE の相互関係の重要性を示唆するものと考えられる。

ところで、AII の PGI_2 産生増大効果は内皮細胞においては認められなかったが、大動脈輪においては認められた。またこれまでの報告では、この効果は単離血管¹²⁾ならびに培養平滑筋細胞¹³⁾では認められているが、ブタ大動脈内皮細胞¹³⁾を用いた検討では認められていないのが現状である。この両者の差異の原因については種差、実験系の差異も考えられるが、単離血管では AII により PGI_2 産生増大を生じない内皮細胞と、これにより PGI_2 産生増大ならびに収縮を生じるとされる平滑筋細胞とが近接して存在するため、AII による大動脈輪の PGI_2 産生における内膜と平滑筋の相互作用の有無を検討する目的で内膜剝離の影響を検討した。内膜剝離大動脈の PGI_2 の基礎産生は減少したが、一

Fig. 7 Interactions of ACE-related substances

方 AII 添加による PGI_2 産生増大作用も内膜剝離により著減したため、大動脈の AII による PGI_2 産生増大効果には内膜が必要であることが示された。佐藤ら¹²⁾は単離した犬腎動脈を用いて内皮細胞を剝離すると PGI_2 産生が有意に低下することを報告しているがこれは本成績を支持するものと考えられる。

さらに佐藤ら¹²⁾は犬腎動脈において AII による産生は血管収縮刺激により生ずることを報告している。そこで本研究では大動脈輪 PGI_2 の産生におよぼす機械的刺激の影響を検討したところ、大動脈輪に機械的刺激を加えた場合には PGI_2 産生は著増した。

したがって大動脈での AII による PGI_2 産生亢進作用における、AII による平滑筋細胞への直接的な PGI_2 産生刺激作用、並びに AII による平滑筋細胞の収縮に基づく内皮細胞への機械的刺激に基づく内皮細胞での PGI_2 産生増大作用の関与が示唆された(図6)。

ところで AII の PGI_2 産生増大効果が内皮細胞においては認められなかった原因としては AII 受容体が存在しないことによる可能性が考えられる。AII 受容体は Goodfriend ら¹⁴⁾が報告して以来、種々の組織においても存在するといわれており、Gunther ら¹⁵⁾により培養平滑筋細胞において既に証明され、一般に平滑筋細胞

には AII 受容体が存在するとされているが、近年 AII 受容体が存在するとされていたヒト血小板ならびに単核球においては AII 受容体が存在しないという報告¹⁶⁾が認められる。また Ody ら¹³⁾は AII による PGI_2 産生増大作用がブタ大動脈培養内皮細胞では認められず、一方培養平滑筋細胞においては認められたこと、さらに ^{125}I -AII を用いた binding assay によっても培養内皮細胞では AII 受容体の存在を証明し得なかったことを報告した。以上より内皮細胞において AII による PGI_2 産生亢進効果が発現しなかった原因として AII 受容体が本細胞には存在しない可能性が考えられた。

したがって大動脈での AII による PGI_2 産生亢進作用においては AII による平滑筋細胞の収縮に基づく内皮細胞への機械的刺激に基づく内皮細胞での PGI_2 産生増大作用の関与が示唆された(図7)。すなわち、内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用は密接かつ重要と考えられ、今後、種々の脈管作動物質の作用機序を考える際には内皮細胞、平滑筋細胞への直接的な作用とともに両者の相互作用も含めて検討しなければならないものと考えられた。

文 献

- 1) Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A. and

- Vane, J.R.: Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall an explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.*, **11**; 323~344, 1977.
- 2) Vanhoutte, P.M. and Rimele, T.J.: Role of endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J. Physiol. (Paris)*, **78**; 681~696, 1982.
- 3) Furchgott, R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, **53**; 557~573, 1983.
- 4) 豊田武夫, 岡野 良, 三上欽司, 金山春洋, 辻肇, 長村吉朗, 林 謙宏, 貝増勲彦, 中川雅夫. 伊地知浜夫: ヒト培養血管内皮細胞の PGI₂ 産生に及ぼす二, 三の薬剤の影響. *血液と脈管*, **14**; 488~490, 1983.
- 5) Instruction Manual For The measurement of 6-keto-prostaglandin F_{1α} levels in tissue and biological fluid, Catalog No. NEK-008, New England Nuclear, June 1982, p. 1~14.
- 6) Lieberman, J.: Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am. J. Med.*, **59**; 365~372, 1975.
- 7) Hong, S.L.: Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein. *Thromb. Res.*, **18**; 787~795, 1980.
- 8) Cinotti, G.A.: Interaction of renin, kinins and prostaglandins. *Hypertension*, **1** (Suppl 1.); 43~51, 1983.
- 9) Mullane, K.M. and Moncada, S.: Prostacyclin mediates the potentiated hypotensive effect of bradykinin following captopril treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **66**; 355~365, 1980.
- 10) Vio, C.P., Guivernau, M., Terrangno, A. and Terrangno, N.A.: Effects of captopril on the biosynthesis of prostaglandins *in vitro*. *Fed. Proc.* **40** (Part 1); 702, 1981.
- 11) Lijnen, P., Fagard, Staessen, J., Verscheuren, L.J. and Amery, A.: Role of various vaso-depressor system in the acute hypertensive effect of captopril in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **20**; 1~8, 1981.
- 12) Satoh, H. and Satoh, S.: Prostaglandin E and I production in isolated dog renal arteries in the absence or presence of vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**; 873~876, 1984.
- 13) Ody, C., Seillan, C. Marie, F.R. and Duval, D.: Angiotensin II dose not any specific prostaglandin secretion in piglet cultured endothelial cells. *Thromb. Res.*, **31**; 219~231, 1983.
- 14) Goodfriend, T.L. and Lin, S.: Receptor for angiotensin I and II. *Circ. Res.* **17** (Suppl.); I-163~I-170, 1970.
- 15) Gunther, S., Gimbrone, M.A. and Alexander, R. W.: Identification and characterization of the high affinity vascular angiotensin II receptor in rat mesenteric artery. *Circ. Res.*, **47**; 278~286, 1980.
- 16) Neyses, L., Locher, R., Wehling, M., Pech, H., Tenschert, W. and Vetter, W.: Angiotensin II binding human mononuclear cells; receptor or fluid endocytosis. *Clin. Sci.*, **66**; 608~612, 1984.