原 著

ヒト培養血管内皮細胞の産生におよぼすアンギオ
テンシン変換酵素関連物質の関与について
——Ca イオンの動態の面からの検討——

沢田 昌平* 白井 馨* 高淵 洋彰* 小林恭一郎*
宇野 雅史* 渡辺 雅彦* 辻 肇* 豊田 武夫*
中川 雅夫*

Effects of angiotensin-I converting enzyme related substances
upon the prostacyclin generation in cultured human vascular
endothelial cells with special reference to the kinetics of Ca^{++}

Shohei SAWADA*, Kaoru SIRAI*, Hiroaki TAKABUTI*, Kyoichiro KOBAYASHI*,
Masashi UNO*, Masahiko WATANABE*, Hajime TSUJI*, Takeo TOYODA*
and Masao NAKAGAWA*

Key words: prostacyclin, cultured human vascular endothelial cell,
captopril, Ca^{++} , angiotensin II

The effects of angiotensin I (AI) converting enzyme (ACE) related substances upon prostacyclin (PGI_2) generation with special reference to the kinetics of Ca^{++} were investigated using cultured human vascular endothelial cells.

Endothelial cells were isolated from human umbilical cord vein and cultured by the modified method of Jaffe et al. PGI_2 generation or Ca^{++} kinetics were measured using 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ RIA assay kit or ^{45}Ca , respectively.

AI or bradykinin (BK) (10^{-6}M) increased PGI_2 generation, however captopril decreased it. On the other hand angiotensin II (AII) did not show any effect. The enhanced PGI_2 generation by AI or BK was remarkably decreased by the pretreatment with an intracellular

* 京都府立医科大学第二内科 [〒602 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町 465], Second Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

受付: 1987. 5. 9. 受理: 1987. 12. 16.

Ca^{++} immobilizer, TMB-8(10^{-4}M). AI and BK enhanced ^{45}Ca uptake, while AII did not show any effect on it, and captopril decreased it.

These results suggested that PGI_2 generation by ACE related substances were closely linked to the Ca^{++} uptake to the cytosol from extracellular space or to the release of Ca^{++} from the storage site.

はじめに

私どもは前回の本学会においてヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生におよぼす bradykinin (以下 BK), angiotensin I (以下 AI), angiotensin II (以下 AII), 並びに captopril (以下 Cap) の影響を angiotensin 変換酵素 (以下 ACE) 活性を含めて検討し報告した¹⁾. 今回は上記の ACE 関連物質の PGI_2 産生におよぼす影響を Ca^{++} の動態の面から検討した.

I. 方 法

1. 内皮細胞培養法

内皮細胞は正常分娩後6時間以内のヒト臍帯静脈を用いて Jaffe²⁾, 豊田³⁾らの方法により分離培養し, confluent 形成した初代培養細胞を以下の実験に供した.

2. 内皮細胞の PGI_2 産生の測定法並びに経時的変化の検討法

1) PGI_2 産生の測定法

血管内皮細胞より上清中に産生遊離される PGI_2 量は, New England Nuclear 社製 [^3H]-6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ assay kit⁴⁾ を用い, PGI_2 の安定代謝産物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ を RIA 法により測定し, PGI_2 量とした. なお本 kit に用いられている 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ の抗体は他の prostaglandins と若干の交差反応を示すがほぼ無視し得るものであった.

2) PGI_2 産生の経時的変化の検討法

内皮細胞の培養液を除去し, conditioned buffer (以下 Buffer A), (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM glucose, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) にて2回洗浄後, Buffer A 500 μl を添加し, 37°C で一定時間保生後, 保生液に産生遊離される PGI_2 量

を測定し, その経時的変化を検討した.

3. 内皮細胞の Ca^{++} 動態の検討法

1) ^{45}Ca uptake の測定並びに経時的変化の検討法

内皮細胞の培養液を除去し Buffer A にて2回洗浄後, 5 $\mu\text{Ci/ml}$ の ^{45}Ca (19.2 mCi/mg CaCl_2 , N.E.N. 社製) を含む Buffer A にて 37°C で一定時間保生後, Buffer A にて速やかに3回洗浄し, 6% trichloroacetic acid 1 ml 添加処理後, rubber spatula により内皮細胞を剝離採取することにより, 細胞内の放射能を測定し, ^{45}Ca uptake とした.

^{45}Ca uptake の経時的変化は保生開始直後, 5分, 10分, 15分, 20分の各時点で検討した.

2) TMB-8 添加の影響の検討法

細胞内 free Ca^{++} の immobilizer である 8-(N, N-diethylamino)-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate hydrochloride (以下 TMB-8⁵⁾), Sigma 社製 [終濃度 (以下 f.c.) 10^{-4}M] 5分間前処置下における, 内皮細胞の PGI_2 産生量に及ぼす影響を検討した.

なお TMB-8 の前処置は, 光学顕微鏡下の内皮細胞の形態に影響せず, また trypan blue による生体染色にも影響しなかった.

4. PGI_2 産生に及ぼす ACE 関連物質の影響の検討法

内皮細胞の保生系に BK (Sigma 社製) (f.c. 10^{-8} , 10^{-6}M), AI (Sigma 社製) (f.c. 10^{-8} , 10^{-6}M), AII (Sigma 社製) (f.c. 10^{-6} , 10^{-4}M), Cap (三共製薬) (f.c. 10^{-9} ~ 10^{-3}M) をそれぞれ添加, 保生し PGI_2 量を測定した.

5. ACE関連物質による PGI_2 の産生に及ぼす TMB-8 の影響の検討法

内皮細胞の保生系を TMB-8 (f.c. 10^{-4}M)

Fig. 1 (A) Time course of PGI₂ generation in the cultured human vascular endothelial cells.
(B) Time course of ⁴⁵Ca uptake in the cultured human vascular endothelial cells.

にて5分間前処置し BK (f.c. 10⁻⁶M), AI (f.c. 10⁻⁶M), AII (f.c. 10⁻⁶M) を添加後, 同様に保生し PGI₂ 量を測定した.

6. 内皮細胞の Ca⁺⁺ uptake に及ぼす ACE 関連物質の影響の検討法

内皮細胞の保生系に BK (f.c. 10⁻⁶M), AI (f.c. 10⁻⁶M), AII (f.c. 10⁻⁶M), Cap (f.c. 10⁻⁵M) を添加後, 3. 1) の方法により同様に保生し ⁴⁵Ca uptake を測定した.

II. 成 績

1. PGI₂ 産生並びに Ca⁺⁺ uptake の経時的変化

内皮細胞より産生遊離される PGI₂ 量は保生開始直後より急増し, 15~20 分後にはほぼ plateau に達した (図 1 (A)). ⁴⁵Ca uptake も保生開始直後より著増を認めたが, PGI₂ 産生量の経時的変化に比しより速やかに増大し, 約 10 分後にはほぼ plateau に達した (図 1 (B)).

そこで以下の薬物添加実験では保生開始 15 分後の時点で PGI₂ 産生並びに ⁴⁵Ca uptake を比較検討した.

Fig. 2 Effect of bradykinin (BK) on PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells.

2. PGI₂ 産生に及ぼす ACE 関連物質の影響

1) Bradykinin

BK (10⁻⁸, 10⁻⁶M) は添加濃度依存性に PGI₂ 産生量を対照に比しそれぞれ 3.25 倍, 4.32 倍

Fig. 3 Effect of angiotensin (AI) on PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells.

Fig. 4 Effect of angiotensin II (AII) on PGI₂ generation in the medium of cultured human vascular endothelial cells.

に増加させた (図 2).

2) Angiotensin I

AI (10⁻⁸, 10⁻⁶M) は添加濃度依存性に PGI₂ 産生量を対照に比しそれぞれ 2.00 倍, 2.88 倍に増加させた (図 3).

3) Angiotensin II

AII (10⁻⁶, 10⁻⁴M) は PGI₂ 産生量には影響しなかった (図 4).

4) Captopril

Cap (10⁻⁷, 10⁻⁵, 10⁻³M) は添加濃度依存性に PGI₂ 産生量を対照に比しそれぞれ 0.36 倍, 0.29 倍, 0.17 倍に抑制したが, 低濃度の Cap (10⁻⁹M) は PGI₂ 産生量に影響しなかった (図 5).

3. ACE 関連物質の PGI₂ 産生に及ぼす TMB-8 の影響

1) Bradykinin

BK による PGI₂ 産生亢進作用は TMB-8 の前処置によりその増大分のみならず基礎産生も著減し, PGI₂ 産生量は TMB-8 非前処置時の 0.10 % まで低下した (表 1).

2) Angiotensin I

AI による PGI₂ 産生亢進作用も BK と同様

Fig. 5 Effect of captopril on PGI₂ generation in medium of cultured human vascular endothelial cells.

に TMB-8 の前処置によりその増大分のみならず基礎産生も著減し, PGI₂ 産生量は TMB-8 非前処置時の 0.11 % まで低下した (表 1).

3) Angiotensin II

AII による PGI₂ 産生量は TMB-8 の前処

Table 1 Effect of TMB-8 on PGI_2 generation in cultured human vascular endothelial cells ($n=6$)

	Control	pretreated with TMB-8 (10^{-4}M , 5 min)
Buffer A	16.11 ± 0.64 (100 %)	$*0.07 \pm 0.02$ (0.43 $\pm$ 0.12 %)
angiotensin I (10^{-6}M)	46.33 ± 0.26 (100 %)	$*0.05 \pm 0.02$ (0.11 $\pm$ 0.04 %)
angiotensin II (10^{-6}M)	16.15 ± 0.90 (100 %)	$*0.09 \pm 0.01$ (0.56 $\pm$ 0.06 %)
bradykinin (10^{-6}M)	70.33 ± 0.76 (100 %)	$*0.07 \pm 0.01$ (0.10 $\pm$ 0.01 %)
captopril (10^{-5}M)	4.65 ± 0.20 (100 %)	—

amount of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (ng/ml/ 2×10^5 cells) and % change
(Mean $\pm$ S.E.)

* $p < 0.001$

Fig. 6 Effect of angiotensin I (AI), angiotensin II (AII), bradykinin (BK), captopril (Cap) on ^{45}Ca uptake in cultured human vascular endothelial cells.

置により TMB-8 非前処置時の 0.56 %まで低下した (表 1)。

4. ^{45}Ca uptake に及ぼす ACE 関連物質の影響

^{45}Ca uptake 量は AI および BK の添加によりそれぞれ対照の 1.33 倍, 1.47 倍に増加したが, AII は 0.97 倍とこれに影響せず, Cap

はこれを 0.83 倍に減少させた (図 6)。

III. 考 察

近年, 種々の生理活性物質の生体での作用を論じる際に細胞レベルでの作用が重要視されており, 細胞レベルでの情報の受容ならびに伝達において, 情報の変換, 増幅の際の生化学的基

盤並びに生理的意義に関心がたかまってきている。この細胞機能調節機構における Ca^{++} , cyclic nucleotides 等の second messenger の重要性は周知であり、私どももこれまで血管内皮細胞の PGI_2 産生遊離機構に関してこれらの因子の役割につき若干報告してきた^{3,6)}。

一方血管内皮細胞は ACE をも産生遊離し、本酵素に関連する諸物質即ち BK, AI, AII 等と PGI_2 産生との関係についての報告は多々あるが、これら諸物質の PGI_2 に及ぼす影響を細胞レベルで Ca^{++} とのかかわりから検討した報告は少ない。本論文ではこの点について若干の検討を加え、考察した。

従来より BK による PGI_2 産生増大効果の発現はおもに細胞外 Ca^{++} の細胞内への流入亢進による、phospholipase A_2 の活性亢進に基づく⁷⁾とされているが本実験では ^{45}Ca の転入実験よりこれを直接証明した。

さらに細胞内 Ca^{++} の immobilizer である TMB-8 が、BK による PGI_2 産生の増加分のみならず、その基礎産生をも著減させたことより、BK による PGI_2 産生の増加機序に細胞外から細胞内への Ca^{++} の流入の増加あるいはこれに基づく Ca^{++} storage site よりの Ca^{++} の遊離の増加が関与すると考えられた。また AI についても ^{45}Ca uptake 並びに TMB-8 の実験から BK の場合と同様の成績が得られたことより、AI による PGI_2 産生の増加機序に同様の Ca^{++} 動態の関与が考えられた。

また AI による PGI_2 産生増加が本実験で確認されたがこの機序として従来より AI から AII への変換を介した AII の作用によるとされている⁸⁾が、本実験系では AII には PGI_2 産生増加効果は認められず、また AI は ^{45}Ca uptake を増加させるが AII はこれに影響しなかったことより、AI および AII による PGI_2 産生増加効果の発現の有無の妥当性が Ca^{++} 流入促進効果の有無の面から裏付けられた。

ところで AII により PGI_2 産生並びに Ca uptake 増加効果が認められなかった原因としては、AII 受容体が内皮細胞には存在しないことによる可能性が考えられる。AII 受容体は平

滑筋細胞を初めとして種々の細胞において存在する⁹⁾といわれていたが、ヒト血小板並びに単核球においては近年否定的な報告が認められている¹⁰⁾。しかも Ody ら¹¹⁾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を用いた実験系では認めず、一方培養平滑筋細胞を用いた実験系ではみとめられること、さらに radioligand として ^{125}I -AII を用いた receptor 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ており、これらは我々の成績を支持するものと考えられる。

また AI により PGI_2 産生並びに ^{45}Ca uptake 増加効果が認められたが、AII にはこれらの増加効果が認められなかったことより、少なくとも内皮細胞においては AI の PGI_2 産生増加は AI 独自の受容体を介した作用機序、あるいは非特異的な作用機序に基づく可能性が考えられた。

さらに従来より Cap 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¹²⁾が、否定的な報告¹³⁾も認められ一定の見解が得られていないのが現状であり、内皮細胞について検討したところ、Cap による PGI_2 産生促進効果は本実験系では認められず、Cap はむしろこれを抑制したが、このことも Cap が ^{45}Ca uptake を抑制したことから裏付けられた。よって Cap は Ca^{++} uptake の抑制を介して、直接 PGI_2 産生を抑制すると考えられた。

以上のことより上記のアンギオテンシン変換酵素関連物質の PGI_2 産生におよぼす影響は Ca^{++} の動態と緊密に関連すると考えられた。

文 献

- 1) 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: ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生におよ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—. 血液と脈管, 17(5): 423~431, 1986.
- 2) Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, R.C.: Culture of human endo-

- thelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.*, **52**: 2475~2756, 1983.
- 3) 豊田武夫, 沢田昌平, 丹羽 勇, 前防則彦, 辻 肇, 三上欽司, 林 謙宏, 木谷輝夫, 貝増勲彦, 中川雅夫, 伊地知浜夫: ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生におよぼす Ca 拮抗薬の影響—細胞内外の Ca^{++} および cyclic nucleotide の関係—. *血液と脈管*, **16**: 247~257, 1985.
 - 4) Instruction Manual for The Measurement of 6-Keto-Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ Levels in Tissue and Biological Fluids, Catalog No. NEK-008, New England Nuclear, 1~14, 1982.
 - 5) Malagodi, M.H. and Chiou, C.Y.: Pharmacological evaluation of a new Ca^{++} antagonist, 8-(N, N-diethylamino)-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate hydrochloride (TMB-8): studies in smooth muscles. *Eur. J. Pharmacol.*, **27**: 25~33, 1974.
 - 6) 丹羽 勇, 沢田昌平, 前防則彦, 辻 肇, 三上欽司, 豊田武夫, 林 謙宏, 中川雅夫, 伊地知浜夫: Nitroglycerine の PGI_2 産生亢進機序における制御機構について. *血液と脈管*, **16**: 71~73, 1985.
 - 7) Hong, S.L. and Levine, L.: Stimulation of prostaglandin synthesis by bradykinin and thrombin and their mechanism of action on MC 5-5 fibroblast. *J. Biol. Chem.*, **251**: 5814~5816, 1976.
 - 8) Kono, T.F., Ikeda, F., Oseko, F., Imura, H. and Endo, J.: Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitor, SQ 14225, in normal men. *Endocrinol. Jpn.*, **26**: 411~418, 1979.
 - 9) 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.
 - 10) Neyses, L., Locher, R., Wehling, M., Pech, H., Tenschert, W. and Vetter, W.: Angiotensin II binding human mononuclear cells; receptor or free fluid endocytosis. *Clin. Sci.*, **66**: 605~618, 1984.
 - 11) 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.
 - 12) Abe, K., Imai, Y., Sato, M., Haruyama, T., Sakurai, Y., Goto, T., Otsuka, K. and Yoshinaga, K.: Implication of endogenous prostaglandin system in the antihypertensive effect of captopril in low renin hypertension. *Jpn. Circ. J.*, **44**: 422~425, 1980.
 - 13) Lijnen, P., Fagard, R., Staessen, J., Verschuren, L.J. and Amery, A.: Role of various vasodepressor system in the acute hypertensive effect of captopril in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **20**: 1~8, 1981.
-