高血圧ストレスモデル血管細胞を用いた細胞応答の解明及び 薬理作用機序探索ツールとしての応用

町田 拓 自

Analysis of Vascular Cell Response to Hypertension Induced by Pressure Loading and Its Application as a Tool for Exploring Pharmacological Modes of Action

Takuji Machida

Department of Pharmacological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of
Hokkaido; 1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan.

(Received June 22, 2016)

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is induced by interleukin-1 β (IL-1 β) stimulation in vascular smooth muscle cells (VSMCs), resulting in the production of nitric oxide and prostaglandins such as PGI₂. The expression of iNOS and COX-2 in cultured VSMCs isolated from 6–7-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) is significantly lower than in cells of normotensive Wistar Kyoto rats (WKY). These reductions are also found in cells exposed to pulsatile atmospheric pressure between 80–160 mmHg at a rate of 4 cycles/min, which simulates systolic hypertension. Docosahexaenoic acid (DHA), an *n*-3 polyunsaturated fatty acid, potentiates IL-1 β -induced iNOS and COX-2 expression in VSMCs isolated from WKY, but not those from SHRSP. In response to endothelial injury at a local site, iNOS and COX-2 induction in VSMCs may function primarily as a defensive and compensatory mechanism for endothelial dysfunction by preventing the development of pathological conditions. Thus, in certain pathological conditions associated with hypertension, vascular walls with reduced iNOS and COX-2 expression may aggravate or initiate further vascular injury. In this situation, DHA may contribute to maintaining homeostasis in VSMCs by potentiating iNOS and COX-2 expression. Using cells isolated from a genetic pathological animal model alongside cells exposed to experimental pathological conditions can be an effective tool for the analysis of cell response to hypertension and exploring pharmacological modes of action *in vitro*.

Key words——vascular smooth muscle; inducible nitric oxide synthase; docosahexaenoic acid

はじめに

血圧調節を始めとする血管恒常性の維持の一端には、血管内皮細胞で産生される多くの生理活性物質が重要な役割を担っている。これらの物質として、血栓形成に関与する組織プラスミノゲン活性化因子や、白血球の内皮付着に関与する intracellular adhesion molecule-1 や vascular adhesion molecule-1 などのほか、種々の血管弛緩因子及び収縮因子が挙げられる。これら弛緩因子と収縮因子の良好なバランスが血管恒常性に寄与し、反対にその破綻が血管病変や血圧調節の異常に深く関与している。代表

的な血管内皮由来弛緩因子として一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 及びプロスタグランジン I₂ (prostaglandin I₂; PGI₂) が挙げられる。ともに血管拡張作用、血小板粘着及び凝集抑制作用、あるいはアポトーシス誘導作用などを持つ。それぞれ血管内皮細胞内の構成型合成酵素である内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase; eNOS) 及びシクロオキシゲナーゼ-1 (cyclooxygenase-1; COX-1) や COX-2 を介して産生されるこれらの因子は、健康な血管における恒常性維持には欠かせない。一方、炎症等による血管傷害部位においては、損傷により内皮細胞機能が保てなくなり、恒常性の維持が困難になる。

血管中膜に位置する平滑筋細胞は、血管の収縮及び弛緩を担う本体であり、上述のような生理活性物質や神経刺激によって機能が調節されている。ま

北海道医療大学薬学部薬理学講座 (〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757)

e-mail: tmachida@hoku-iryo-u.ac.jp

本総説は、平成 27 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

た、血管平滑筋細胞では、炎症性サイトカイン等の刺激により誘導型 NOS (inducible NOS; iNOS) 及び COX-2 が誘導され、大量の NO 及び PGI₂ が産生される。

さらに血管は、生理活性物質や神経刺激のほかにも常にメカニカルストレスに曝されている。血管にかかるメカニカルストレスは、大きくずり応力 (shear stress)、圧力 (pressure) 及び伸展 (stretch) に分けられる。血管内皮細胞はずり応力の影響を大きく受ける一方、血管平滑筋細胞は圧力の影響を受ける。

筆者はこれまで循環器疾患での血管平滑筋細胞機能の変化と生理活性物質の影響について、病態モデル動物から単離した培養血管平滑筋細胞や、細胞に収縮期高血圧を擬似的に再現した圧力を負荷した血管平滑筋細胞などの高血圧モデル血管平滑筋細胞を用いて基礎的検討を行ってきた。

一方、*n*-3 系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA) やエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) を多く含む魚油の摂取が、循環器疾患に有用であることは周知の事実であり、実際に DHA 及び EPA を含んだ健康食品や医薬品が上市されている。降圧作用に関しては、EPA よりも DHA がより強力であり、魚油の循環器疾患への有用性の本体は DHA とも考えられている。¹⁾ DHA の循環器疾患に対する有用性の機序の一部には、血管細胞への直接的な影響が関与していることが報告されていることから、²⁻⁴⁾ 筆者は上述の培養血管平滑筋細胞を用いて DHA の薬理作用を検討してきた。

本稿では、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP) や圧力負荷装置を用いた高血圧モデル血管平滑筋細胞を用いてこれまで行ってきた細胞機能変化と病態との関連についての薬理学的研究と、病態モデル細胞を用いた DHA の新たな薬理作用機序の探索研究について概説する。

病態モデル動物由来培養血管平滑筋細胞を用いた検討

SHRSP は、高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats; SHR) から分離された亜系であり、SHR より血圧が高値を示し、早期に脳卒中を発症して死亡する。⁵⁾ 高血圧発症直前若しくは

直後である 6-7 週齢の雄性 SHRSP の胸部大動脈から単離、培養した血管平滑筋細胞では、セロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 及びアンギオテンシン II 刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が、対照動物であるウィスター京都ラット (Wistar Kyoto rats; WKY) 由来のものよりも有意に高い。⁶⁾

これらの細胞を用いてインターロイキン-1β (interleukin-1β; IL-1β) 刺激による NO 産生量を測定したところ、SHRSP 由来の細胞において WKY 由来細胞と比較して有意な産生量の低下が認められた。⁷⁾ IL-1β 刺激による NO 産生は iNOS に由来するので、⁸⁾ SHRSP 及び WKY の iNOS タンパク質発現量を比較検討したところ、IL-1β 刺激による iNOS 発現量の誘導能も SHRSP 由来細胞で有意に低下していることが確認された。また、IL-1β 刺激による NO 産生の増加は 5-HT 処理によって濃度依存的に抑制されるが、この 5-HT 処理による NO 産生抑制作用は、SHRSP 由来細胞において亢進していた。⁹⁾

一方、SHRSP 由来細胞では IL-1β 刺激による COX-2 発現量も低下しており、それに伴う PGI₂ 産生量も有意に低下していた。⁷⁾

以上より、SHRSP 由来血管平滑筋細胞では、IL-1β 刺激による iNOS 及び COX-2 発現能が低下しており、このことが NO 及び PGI₂ 産生能の低下に関連していることを明らかにした。この原因は明らかではないが、用いた細胞は高血圧発症直前又は直後の動物から単離しているため、高血圧による二次的な影響であることは考え難い。遺伝的な理由により、SHRSP の細胞ではカルシウム応答性の亢進と、血管弛緩因子産生能の低下という特徴を有し、このことが SHRSP の病態の発症及び進展に関連していると考えられる。

圧力負荷装置を用いた検討

筆者の所属する研究室では、培養細胞に高血圧を想定した圧力を負荷できる圧力負荷装置を開発した

町田拓自

北海道医療大学薬学部 准教授、博士 (薬学)。北海道医療大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。2003 年米国コーネル大学医学部訪問研究員 (Roberto Levi 教授)、2006 年北海道医療大学薬学部助手、助教、講師を経て 2015 年より現職。専門：薬理学。

Fig. 1. Pulsatile Pressure-loading Apparatus

(Fig. 1).¹⁰⁾ 本装置の加圧タンク内に培養細胞を静置し、任意の圧力で5% CO₂を含んだ大気を送り込むことで内圧を変化できる。実験では、加圧タンク内の内圧を収縮期高血圧を想定した80 mmHg（拡張期血圧を想定）と160 mmHg（収縮期血圧を想定）との間で毎分約4回の頻度で往復させ、細胞に圧力を負荷（波動負荷）した。

6-7週齢の雄性 Wistar ラット由来の培養血管平滑筋細胞を IL-1 β で刺激すると同時に細胞を圧力負荷装置に入れて、収縮期高血圧を想定した圧力を負荷すると、24時間後にかけて誘導される iNOS 発現量が圧力負荷によって時間依存的に有意に抑制された (Fig. 2).¹¹⁾ また、iNOS の補酵素であるテトラヒドロピオプテリンの産生の律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I (GTP cyclohydrolase I; GTPCH) も iNOS と同様に IL-1 β 刺激によって誘導されるが、この GTPCH mRNA 発現も収縮期高血圧を想定した圧力負荷により有意に抑制された。さらに、IL-1 β 刺激によって培地中に遊離された NO 産生量も、同条件の圧力負荷によって有意に抑制された。これらの抑制作用は、正常血圧を想定した 80 mmHg と 120 mmHg とを往復させた波動負荷では認められなかった。また、構成型酵素である eNOS 及び神経型 NOS 発現は、IL-1 β 及び圧力負荷による著明な影響を受けなかった。これらのことから、血管平滑筋細胞での iNOS 発現系は、圧力の高さあるいは最低圧力と最高圧力の高低差依存的に抑制されることが明らかとなった。¹¹⁾

続いて圧力ストレスによる iNOS 発現抑制作用の機序を検討した。血管平滑筋細胞において IL-1 β 刺激による iNOS 発現誘導には extracellular signal-

Fig. 2. Pulsatile Pressure Stress Reduces iNOS Protein Expression Induced by IL-1 β in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Cells were treated with the indicated concentrations of IL-1 β for the indicated time periods (A) or 24 h (B) in the absence or presence of pulsatile atmospheric pressure between 80 and 160 mmHg. A and B: A representative blotting image. (C) Summary of densitometric analysis expressed by taking samples treated with IL-1 β under non-pressurized conditions as 1. Bars show mean $\pm$ S.E.M. values ($n=8$). * $p<0.05$ vs. IL-1 β under non-pressurized conditions. Adopted from Ref. 11) with permission.

regulated kinase (ERK) の活性化とその下流に存在する nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化が必須である。ERK は、IL-1 β 刺激後 1 時間以内に起こる一過性の活性化と、その後再び 2 時間程で活性化され、それが少なくとも IL-1 β 刺激後 24 時間まで持続する持続性の活性化の 2 相性を示す。^{8,12)} iNOS の発現には 2 相目の持続性の活性化が必要なことから、この持続性 ERK 活性化に及ぼす圧力負荷の影響を次に検討した。その結果、収縮期高血圧を想定した圧力負荷は、持続性 ERK 活性化を有意に抑制した。さらに同圧力負荷は IL-1 β 刺激による NF- κ B p65 のリン酸化及び、I- κ B α のリン酸化も有意に抑制した。一方、圧力負荷は IL-1 β 刺激によりリン酸化された結果、ユビキチン化を受け減少した I- κ B β 発現には影響を与えなかった。¹¹⁾

以上より、収縮期高血圧を想定した圧力負荷は、

Fig. 3. Possible Mechanisms of Modulating Vascular Smooth Muscle Cells Function by High Pressure and DHA at a Local Site of Vascular Injury, Such as Atherosclerotic Lesion

血管平滑筋細胞において $IL-1\beta$ 刺激による iNOS 発現誘導能を低下させ、この機序に ERK-NF- κ B 活性化経路の抑制が関与していることを明らかにした。また筆者は、同圧力負荷が $IL-1\beta$ 刺激による COX-2 発現も抑制する知見を見出ししている（未発表）。 $IL-1\beta$ 刺激による iNOS と COX-2 の誘導機序は異なっており、現在 COX-2 発現抑制作用機序について検討を行っている。

高血圧モデル血管平滑筋細胞を用いた DHA の薬理作用機序の検討

先に述べたように、DHA は降圧作用を有する。筆者の所属する研究室においても、1% 及び 5% DHA 含有飼料で SHRSP を 6 週齢から 14 週間飼育すると、高血圧症発症が著明に抑制されることを報告している。¹³⁾ またこの際、SHRSP の腎機能障害、血清脂質代謝異常、血液粘稠度上昇などが改善され、寿命が延長する。さらに、この機序の一端を明らかにする目的で、血管平滑筋細胞機能に与える DHA の影響について検討してきた。上述した実験に引き続き、これから述べる実験にもすべて 6-7 週齢の雄性ラットから単離した培養血管平滑筋細胞を使用している。

血管平滑筋細胞の収縮・弛緩反応の反応性は、細胞内 Ca^{2+} 濃度により調節される。先に述べたように培養血管平滑筋細胞では、WKY 由来細胞と比較

して、無刺激時や 5-HT 及びアンギオテンシン II 刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に高い。この細胞内 Ca^{2+} 代謝に及ぼす DHA (30 μ M) の影響を検討すると、WKY 由来の細胞では DHA 処理により、5-HT やアンギオテンシン II 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が有意に抑制される。一方、SHRSP 由来の細胞では DHA の作用が現れ難い。^{6,14)}

DHA による降圧作用の機序として NO 産生系に対する影響が関連していると考えられたことから、次に培養血管平滑筋細胞における NO 産生と iNOS 発現について検討した。WKY 由来細胞に $IL-1\beta$ 刺激と同時に DHA を共存させ 48 時間後、培地中に遊離した NO 産生量を測定したところ、DHA は 30 μ M まで濃度依存的に NO 産生を増加させた。同様に DHA は、 $IL-1\beta$ 刺激による iNOS タンパク質及び mRNA 発現も増強させた。EPA の作用についても同様に検討したところ、DHA と比較するとやや弱いものの、同様に NO 産生を増加させた。¹⁵⁾ また、同じく WKY 由来細胞において DHA 処理は $IL-1\beta$ 刺激による COX-2 タンパク質発現も増強させた。¹⁶⁾ 一方、*n*-6 系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は、iNOS タンパク質及び mRNA 発現と COX-2 タンパク質発現に影響を与えなかった。したがって iNOS や COX-2 など誘導型酵素発現の増強作用は *n*-3 系多価不飽和脂肪酸に特有の作用であ

ることが推察された。^{15,16)}

興味深いことに、マクロファージにおいては、*n*-3 系多価不飽和脂肪酸は、サイトカイン刺激による NF- κ B の活性化を抑制し、iNOS 発現及び NO 産生を減少させることが報告されている。^{17,18)} さらに *n*-3 系多価不飽和脂肪酸は、ヒト直腸がん細胞や 70 W メラノーマ細胞においては COX-2 発現を抑制する。^{19,20)} これら矛盾する報告の原因は現在のところ明らかではないが、*n*-3 系多価不飽和脂肪酸の作用は血管細胞系と炎症細胞系やがん細胞系など細胞種により異なると考えられる。

また、SHRSP 由来の細胞においては DHA による iNOS, COX-2 発現増強作用は認められなかった。上述した DHA による細胞内 Ca^{2+} 代謝抑制作用、iNOS 及び COX-2 発現増強作用は、SHRSP 由来の細胞では、培養血管平滑筋細胞を用いて短時間 (2-6 日間) 処理するといった *in vitro* の実験系では現れ難いことが明らかとなった。SHRSP では細胞膜の脂肪酸組成が変化していることやタンパク質発現能が低下していることが関連していると考えられる。しかし、生体に長期投与した場合には血清脂質代謝改善作用などの間接的な作用も加わり、薬理作用が発現してくるものと考えている。

現在、圧力負荷装置を用いた高血圧モデル血管細胞における DHA の薬理作用を検討している。先に述べたように、収縮期高血圧を想定した圧力ストレスを Wistar ラット由来細胞に負荷すると IL-1 β 刺激による iNOS 発現が抑制される。DHA は、この圧力負荷環境下においても iNOS 発現を mRNA レベルから増強させた (未発表)。興味深いことに、DHA による iNOS 発現増強作用は、通常培養した細胞よりも圧力負荷細胞で強かった。本結果は、遺伝的病態モデルである SHRSP 由来細胞で得られた結果と異なり、DHA の薬理作用を考察する上で新たな示唆をもたらしている。

おわりに

遺伝的高血圧モデル動物である SHRSP から単離した血管平滑筋細胞及び、圧力負荷装置を用いて収縮期高血圧を擬似的に再現した培養血管平滑筋細胞を用いた検討において、これら細胞では血管弛緩因子である NO 及び PGI₂ をそれぞれ産生する iNOS 及び COX-2 発現能が低下していることを明らかにした。Figure 3 に示すように血管平滑筋細胞におい

て IL-1 β などのサイトカインにより誘導される iNOS 及び COX-2 発現は、血管傷害部位において損傷を受けた血管内皮細胞での eNOS 及び COX-1 を介した血管弛緩因子の産生低下を代償する役割を担っていると考えられる。²¹⁾ 事実、アンジオテンシン II、5-HT 及びスフィンゴシン 1-リン酸など血管収縮性生理活性物質は、血管平滑筋細胞の iNOS 発現を抑制する。^{8,22,23)}

DHA による血管平滑筋細胞への直接の作用として、細胞内 Ca^{2+} 代謝抑制作用のほか、iNOS 及び COX-2 発現増強作用を明らかにした。これら誘導型酵素の増強作用は、SHRSP 由来の細胞では認められ難く、このことが SHRSP の病態進展と関連している可能性がある。一方、収縮期高血圧を想定した圧力を負荷した細胞においては DHA による iNOS 及び COX-2 発現増強作用が認められた。

SHRSP 由来細胞や高血圧ストレスを *in vitro* で再現できる圧力負荷装置を用いての更なる研究が、生理活性物質や循環器疾患関連薬の薬理作用探索に有用な知見をもたらすことを信じて、今後もこの分野での研究を推進していきたい。

謝辞 本研究の遂行に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道医療大学薬学部 平藤雅彦教授、飯塚健治教授に心より感謝致します。また、本研究は日本学術振興会若手研究 (B)、秋山記念生命科学振興財団、北海道医療大学個体差健康科学研究所の研究助成による支援を受けたものであることを付記いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Hirafuji M., Machida T., Hamaue N., Minami M., *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 308-316 (2003).
- 2) Yin K., Chu Z. M., Beilin L. J., *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 991-997 (1991).
- 3) Mano M. T., Bexis S., Abeywardena M. Y., McMurchie E. J., King R. A., Smith R. M., Head R. J., *Blood Press.*, **4**, 177-186 (1995).
- 4) McLennan P., Howe P., Abeywardena M., Muggli R., Raederstorff D., Mano M., Rayner T., Head R., *Eur. J. Pharmacol.*, **300**, 83-89

- (1996).
- 5) Okamoto K., Yamori Y., Nagaoka A., *Circ. Res.*, **34/35** (Suppl. I), 143–153 (1974).
 - 6) Hirafuji M., Ebihara T., Kawahara F., Nezu A., Tanimura A., Saito H., Minami M., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **102**, 29–42 (1998).
 - 7) Hirafuji M., Tsunoda M., Machida T., Hamaue N., Endo T., Miyamoto A., Minami M., *Life Sci.*, **70**, 917–926 (2002).
 - 8) Machida T., Hamaya Y., Izumi S., Hamaya Y., Iizuka K., Igarashi Y., Minami M., Levi R., Hirafuji M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 200–209 (2008).
 - 9) Hirafuji M., Kanai Y., Kawahara A., Machida T., Hamaue N., Saito H., Minami M., *Biog. Amines*, **18**, 391–402 (2004).
 - 10) Iizuka K., Machida T., Kawaguchi H., Hirafuji M., *Cardiovasc. Drug Ther.*, **22**, 383–390 (2008).
 - 11) Machida T., Iizuka K., Shinohara K., Hatakeyama N., Nakano K., Kubo Y., Hirafuji M., *Eur. J. Pharmacol.*, **731**, 44–49 (2014).
 - 12) Jiang B., Brecher P., Cohen R. A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1915–1920 (2001).
 - 13) Kimura S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 607–619 (2000).
 - 14) Hirafuji M., Ebihara T., Kawahara F., Hamaue N., Endo T., Minami M., *Eur. J. Pharmacol.*, **427**, 195–201 (2001).
 - 15) Hirafuji M., Machida T., Tsunoda M., Miyamoto A., Minami M., *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 613–619 (2002).
 - 16) Machida T., Hiramatsu M., Hamaue N., Minami M., Hirafuji M., *J. Pharmacol. Sci.*, **99**, 113–116 (2005).
 - 17) Khair-El-Din T., Sicher S. C., Vazquez M. A., Chung G. W., Stallworth K. A., Kitamura K., Miller R. T., Lu C. Y., *J. Exp. Med.*, **183**, 1241–1246 (1996).
 - 18) Ohata T., Fukuda K., Takahashi M., Sugimura T., Wakabayashi K., *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 234–237 (1997).
 - 19) Calviello G., Di Nicuolo F., Gragnoli S., Piccioni E., Serini S., Maggiano N., Tringali G., Navarra P., Ranelletti F. O., Palozza P., *Carcinogenesis*, **25**, 2303–2310 (2004).
 - 20) Denkins Y., Kempf D., Ferniz M., Nileswhar S., Marchetti D., *J. Lipid Res.*, **46**, 1278–1284 (2005).
 - 21) Machida T., Matamura R., Iizuka K., Hirafuji M., *J. Pharmacol. Sci.*, doi: 10.1016/j.jphs.2016.05.010 (2016).
 - 22) Xu S., Zhi H., Hou X., Jiang B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 543–548 (2011).
 - 23) Machida T., Iizuka K., Hirafuji M., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1416–1419 (2013).