



Angiotensin II Inhibits Cytokine-stimulated Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

中山, 一郎

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1997-10-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2165

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002165>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 中山一郎

(兵庫県)

博士の専攻 分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1588号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成9年10月15日
学位論文題目	Angiotensin II Inhibits Cytokine-stimulated Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Vascular Smooth Muscle Cells (血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシンIIの誘導型NO合成酵素の発現抑制作用)
審査委員	主査 教授 横山光宏 教授 尾原秀史 教授 中村俊一

論文内容の要旨

I. 緒言

一酸化窒素(NO)は生体内において種々の生物学的活性を有し、血管壁では、血管平滑筋の弛緩や血小板の接着・凝集の抑制、血管平滑筋細胞の増殖・肥大の抑制作用等を示す。NOは、NO合成酵素(NOS)の働きでL-アルギニンより合成されるが、正常血管では内皮細胞が常時発現する構成型NOSによって産生され、内皮由来弛緩因子として局所循環や血圧の調節に関与する。しかし、傷害血管では血管平滑筋細胞よりインターロイキン-1 β (IL-1 β)や腫瘍壞死因子 α (TNF- α)等のサイトカイン刺激やエンドトキシンに反応して発現する誘導型NOS(iNOS)を介したNO産生が行われる。実際、モデル動物においてバルーンカテーテルの傷害部位でNO産生が誘導されることが示されており、これらの病態下では血管傷害部位に集積したマクロファージやT細胞から放出される炎症性サイトカインに反応し、血管平滑筋細胞でiNOSの発現が誘導され、産生されたNOが動脈硬化や経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の血管傷害部位の病態を修飾すると推定される。一方、強力な血管収縮物質であるアンジオテンシンⅡが傷害血管における血管平滑筋細胞の増殖を促進することや、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が傷害血管での平滑筋増殖を抑制することが報告されており、アンジオテンシンⅡもまた血管系の肥大増殖に重要な役割を果たすと考えられている。本研究においては血管平滑筋細胞におけるiNOS発現とNO産生に対するアンジオテンシンⅡの効果を検討した。

II. 方法

細胞培養

血管平滑筋細胞は、Guntherらの方法によりラット胸部大動脈から酵素処理にて分離し、10%胎児仔牛血清を含んだDulbecco's modified Eagle's培地を用いて継代培養し、第9-18代のものを使用した。これら細胞はコンフルエントとなった状態より48時間無血清培地にて培養し種々の刺激を加えた。

NO産生の測定

NOの安定な代謝産物であるnitrite (NO₂) を比色法で測定した。NO₂が蓄積した培養上清に等量のGriess試薬 (0.1%ナフチルエチレンジアミン2塩酸塩 : 1%スルファニルアミド / 5%リン酸 = 1 : 1) を加え、550nmにおける吸光度を求めNaNO₂の標準曲線よりNO₂濃度を算出した。

iNOS mRNAの解析

リポポリサッカライド及びサイトカインで刺激して得られたマウスマクロファージ細胞J774A.1よりRNAを抽出し、逆転写酵素により得られたcDNAをPCR法により増幅させiNOS cDNA断片 (1033bp : nucleotides1621-2653) を調整した。血管平滑筋細胞からはChomczynski及びSacchiらの方法に従い、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform) 法により全RNAを抽出した。25 μgの全RNAを1%アガロースにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した後、³²PでラベルしたiNOS cDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、FUJIX Bio-imaging analyzer BAS2000にてiNOS mRNAの解析を行った。

iNOS蛋白質の解析

細胞懸濁液を超音波処理し、100,000Gで20分間遠心分離した。次に、上清に含まれる蛋白質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はその後、iNOSに対するポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼでラベルしたdonkey anti-rabbit IgGを用いてウエスタンプロット法を行い、ジアミノベンジジンとNiCl₂を加えることにより発色する125kDaのiNOSの蛋白質バンドを定量した。

III. 結 果

血管平滑筋細胞において、無刺激又はアンジオテンシンⅡの単独投与のみではNO産生は認められなかった。血管平滑筋細胞にIL-1 β刺激を加えると6時間以内にNO産生が始まり、24時間以上にわたって時間経過と共に著明な増加が認められた。アンジオテンシンⅡをIL-1 βと同時に投与すると、IL-1 βによるNO産生はアンジオテンシンⅡの濃度依存的に抑制された。この抑制効果はAT1受容体拮抗薬であるCV-11974を加えると濃度依存的に阻害されたが、AT2受容体拮抗抗体であるPD-123319では阻害されなかった。それぞれの受容体拮抗薬単独ではIL-1 β刺激後のNO産生には影響を与えたかった。以上の結果から血管平滑筋細胞において、アンジオテンシンⅡはIL-1 β刺激によるNO産生を抑制し、この抑制作用はAT1受容体を介するものであることが明らかになった。

次に、アンジオテンシンⅡによるNO産生抑制機構を解明するため種々の時間にアンジオテンシンⅡを投与したところ、IL-1 β刺激後12時間以上経て投与した場合には抑制作用は認められず、抑制作用の発現にはIL-1 β刺激後6時間以内にアンジオテンシンⅡを添加する必要があった。従って、アンジオテンシンⅡはIL-1 βによるiNOSの発現を抑制する可能性が推定されたので次にiNOSmRNAと蛋白レベルでの発現を解析した。

コントロール及びアンジオテンシンⅡ単独投与ではiNOS mRNA及び蛋白レベルには影響がなかったが、アンジオテンシンⅡは濃度依存的にIL-1 βによるiNOS mRNAと蛋白質の発現を抑制した。

血管平滑筋細胞では、IL-1 βの代わりにTNF- α刺激を加えた場合も、iNOS mRNA及び蛋白の発現を介して著明なNO産生が認められた。IL-1 β刺激を加えた場合と同様に、アンジオテンシンⅡはTNF- α刺激によるiNOS mRNA及び蛋白レベルの発現とNO産生を著明に抑制した。

一方、血管平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡはAT1受容体を介してCキナーゼの活性化を引き起こす。Cキナーゼ活性化作用のあるホルボールエステル（PMA）と膜透過型合成ジアシルグリセロール（DOG）もアンジオテンシンⅡと同様に、IL-1 β によるNO産生を濃度依存的に抑制した。この抑制に必要なPMAとDOG濃度はCキナーゼの活性化に必要な濃度と同等であった。PMA, DOG単独投与ではNO産生には全く影響しなかった。

IV. 考 察

本研究は協力な血管収縮物質であるアンジオテンシンⅡの血管平滑筋細胞におけるNO産生に対する効果を検討したものである。血管平滑筋細胞はIL-1 β やTNF- α 等のサイトカイン刺激でiNOSの発現を介してNO産生を行なうが、アンジオテンシンⅡはサイトカイン刺激によるNO産生をiNOSの発現レベルで著明に抑制した。アンジオテンシンⅡの受容体にはAT1, AT2の2つのサブタイプが存在するが血管収縮に関してはAT1受容体が優位であると考えられている。今回の血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシンⅡによるNO産生の抑制作用もAT1受容体の活性化を介して行われていた。更に、AT1受容体はイノシトール脂質の分解反応を介するシグナル伝達系と連関していることより、本伝達系の細胞質へのCa²⁺動員とCキナーゼの活性化のいずれが、アンジオテンシンⅡによるNO産生の抑制機序に関与するかを検討した結果、Cキナーゼを選択的に活性化するPMAやDOGはアンジオテンシンⅡと同様のNO産生の抑制作用が認められた。この結果は、ラット肝細胞でリポポリサッカライド刺激によるiNOSの発現がPMAにて抑制されたとするHortelanoらの報告に一致するものと考えられた。一方、細胞質へのCa²⁺動員を選択的に引き起こすイオノマイシンのNO産生抑制効果は乏しかった。Hauschmidtらのマクロファージを用いて、リポポリサッカライド刺激によるiNOSの発現は、細胞質へのCa²⁺動員によっては抑制されないとする類似の報告を行っている。以上の結果から、血管平滑筋細胞において、サイトカイン刺激によるiNOS発現に対するアンジオテンシンⅡの抑制効果は主としてCキナーゼの活性化を介するものと考えられた。

NOは血管弛緩や血小板凝集の抑制のみならず血管平滑筋細胞の増殖をも抑制すると考えられており、動脈硬化巣やPTCA後の再狭窄を抑制すると推定されている。アンジオテンシンⅡがiNOS発現及びNO産生を抑制するという本研究の成果によって、アンジオテンシンⅡが直接的に細胞増殖促進作用を有するとともに細胞増殖抑制的に働くNO産生を抑制して間接的にも動脈硬化やPTCA後の平滑筋細胞を促進する可能性が明らかにされた。

V. 結 論

アンジオテンシンⅡは、血管平滑筋細胞においてAT1受容体を介して、サイトカイン刺激によるNO産生をiNOSのmRNA発現レベルで抑制した。この抑制作用は主としてCキナーゼを介するものと考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

一酸化窒素（NO）は生体内において種々の生物学的活性を有し、血管壁では、血管平滑筋の弛緩や血小板の接着・凝集の抑制、血管平滑筋細胞の増殖・肥大の抑制作用等を示す。NOは、NO合成酵素（NOS）の働きでL-アルギニンより合成される。傷害血管では血管平滑筋細胞よりインターロイキン-1 β （IL-1 β ）や腫瘍壞死因子 α （TNF- α ）等のサイトカイン刺激やエンドトキシンに反

応して発現する誘導型NOS (iNOS) を介したNO産生が行われる。実際、モデル動物においてバルーンカテーテルの傷害部位でNO産生が誘導されることが示されており、これらの病態下では血管傷害部位に集積したマクロファージやT細胞から放出される炎症性サイトカインに反応して、血管平滑筋細胞でiNOSの発現が誘導され、産生されたNOが動脈硬化や経皮的冠動脈形成術 (PTCA) 後の血管傷害部位の病態を修飾すると推定される。一方、強力な血管収縮物質であるアンジオテンシンIIが傷害血管における血管平滑筋細胞の増殖を促進することや、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が傷害血管での平滑筋増殖を抑制することが報告されており、アンジオテンシンIIもまた血管系の肥大増殖に重要な役割を果たすと考えられている。本研究において血管平滑筋細胞におけるiNOS発現とNO産生に対するアンジオテンシンIIの効果を検討した。NO産生はその安定な代謝産物のnitrite (NO_2) をGriess法を用いて測定した。iNOSmRNAはマウスマクロファージ細胞J774A.1より調整したiNOScDNA断片を用いてノザーンプロット法にて解析した。iNOS蛋白はiNOSに対するポリクロナール抗体を用いてウエスタンプロット法にて解析した。

ラット大動脈から分離培養した血管平滑筋細胞において、無刺激又は、アンジオテンシンIIの単独投与のみではNO産生は認められなかった。血管平滑筋細胞にIL-1 β 刺激を加えるとNO産生は24時間以上にわたって時間経過と共に著明に増加した。IL-1 β によるNO産生はアンジオテンシンIIの同時投与によって抑制された。この抑制効果はAT1受容体拮抗薬CV-11974によって阻害されたが、AT2受容体拮抗薬PD-123319では阻害されなかった。それぞれの受容体拮抗薬単独ではIL-1 β 刺激後のNO産生には影響を与えたなかった。以上の結果からアンジオテンシンIIはIL-1 β 刺激によるNO産生を抑制し、この抑制作用はAT1受容体を介するものであることが明かになった。

次に、アンジオテンシンIIによるNO産生抑制機構を解明するためiNOSmRNAと蛋白レベルの発現への影響を解析した。コントロール及びアンジオテンシンII単独投与ではiNOSmRNA及び蛋白レベルには影響がなかったが、アンジオテンシンIIはIL-1 β によるiNOSmRNAと蛋白質の発現を抑制した。血管平滑筋細胞では、TNF- α 刺激によっても、iNOSmRNA及び蛋白の発現を介して著明なNO産生が認められた。アンジオテンシンIIはTNF- α 刺激によるiNOSmRNA及び蛋白レベルの発現とNO産生も著明に抑制した。一方血管平滑筋細胞においてアンジオテンシンIIはAT1受容体を介しC-キナーゼの活性化を引き起こす。C-キナーゼ活性化作用のあるホルボールエステル (PMA) と膜透過型合成ジアシルグリセロール (DOG) もアンジオテンシンIIと同様に、IL-1 β によるNO産生を濃度依存的に抑制した。PMA、DOG単独投与ではNO産生には全く影響しなかった。一方、細胞質へのCa²⁺動員を選択性的に引き起こすイオノマイシンのNO産生抑制効果は乏しかった。以上の結果から、血管平滑筋細胞において、サイトカイン刺激によるiNOS発現に対するアンジオテンシンIIの抑制効果は主としてC-キナーゼの活性化を介するものと考えられた。アンジオテンシンIIがiNOS発現及びNO産生を抑制するという本研究の成果は、アンジオテンシンIIが直接的に細胞増殖促進作用を有するとともに細胞増殖抑制的に働くNO産生を抑制して間接的にも動脈硬化やPTCA後の平滑筋増殖を促進する可能性を示している。

本研究は血管平滑筋細胞における誘導型NOS発現とNO産生に及ぼすアンジオテンシンII効果について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアンジオテンシンIIは、血管平滑筋細胞においてAT1受容体-Cキナーゼ活性化を介して、サイトカイン刺激によるNO産生をiNOSmRNA発現レベルで抑制するという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。