

⊖

アンジオテンシン変換酵素阻害薬による
エンドセリン分泌抑制効果に関する研究
—培養ヒト血管内皮細胞での検討—

吉田浩昭

岩手医科大学医学部、生理学第一講座

(主任:佐藤誠教授)



岩手医科大学医学部、内科学第二講座

(主任:平盛勝彦教授)



Inhibitory Effect of Angiotensin Converting
Enzyme Inhibitors for Endothelin Secretion
from Cultured Human Endothelial Cells

Hiroaki Yoshida

Department of Physiology I, School of Medicine,
Iwate Medical University Morioka, Japan

(Prof. M. Sato)

Department of Medicine II, School of Medicine,
Iwate Medical University Morioka, Japan

(Prof. K. Hiramori)

ABSTRACT

The purpose of this experiment was examined whether angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) would inhibit endothelin secretion from cultured human endothelial cells. Confluent umbilical-vein endothelial cells were incubated for 6 hours in multi-well plates with a culture medium containing captopril, or enalaprilat. Immunoreactive endothelin in the medium was measured by radioimmunoassay. Calf serum (CS) stimulated endothelin release in a concentration-dependent manner, and both ACEIs inhibited the CS-stimulated endothelin release in a concentration-dependent manner. To explore the mechanisms of ACEI-induced suppression of endothelin release, the effects on endothelin release of angiotensin II, angiotensin converting enzyme, bradykinin, and sodium nitroprusside were also examined, and compared with ACEIs. Although angiotensin II and angiotensin converting enzyme were found to have no effect, bradykinin and sodium nitroprusside showed a dose-dependent suppressive effect on ET release. In addition, indomethacin did not affect ET secretion in the culture conditions. These results indicate that ACEIs inhibit CS-stimulated release of endothelin from human endothelial cells, and suggest indirectly that the mechanism of this suppression may be partly due to ACEI-induced potentiation of bradykinin effect, which would automatically decreased the synthesis in the endothelial cells.

Key Words

- 1) angiotensin converting enzyme inhibitor
- 2) endothelin
- 3) cultured human endothelial cell

running title

ACE阻害薬によるエンドセリン分泌抑制

はじめに

1988年、柳沢らはブタ血管内皮細胞の培養液中から、強力で持続的な血管収縮作用を有するペプチドを発見し、エンドセリンと命名した¹⁾。その後、エンドセリンは内皮細胞や平滑筋細胞の増殖促進作用を有することが示され^{2) 3)}、さらに血中のエンドセリン濃度が、本態性高血圧症患者や動脈硬化症患者では上昇していることが報告された^{4) 5)}。これらの事よりエンドセリンは、血管の過剰収縮や動脈硬化の病因に重要な役割を持つことが推測されている。しかし、エンドセリンがどのようなメカニズムにより血管内皮細胞から分泌されるかは不明であり、さらに内皮細胞から分泌される他の血管作動性物質と、どのような相互作用を有するかも明らかにされていない。

近年、循環血漿中のみならず、血管内皮にも完全なレニン・アンジオテンシン系が存在することが報告されており^{6) 7)}、血管内皮細胞はACE阻害薬の重要な作用組織の一つと推測されて

いる。事実、ACE阻害薬は、高血圧症ラットから摘出した大動脈でアセチルコリンによる内皮依存性血管拡張反応の低下を改善することや⁸⁾、動物実験において、バルーンによる血管損傷後の内膜新生を抑制することなど⁹⁾、内皮細胞や平滑筋細胞に対しても種々の影響をおよぼしていることが示唆されている。しかし、この内皮細胞上のレニン・アンジオテンシン系の生理的な役割や内皮細胞から分泌される種々の血管作動性物質との相互作用に関しては不明である。

本研究では、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬により血管内皮に存在する本酵素を抑制した場合、エンドセリンの分泌にどのような影響を与えるか、さらに同薬の投与により変動すると考えられる種々の血管作動性物質(アンジオテンシンII、ブラヂキニンなど)が、エンドセリン分泌にどのような影響をおよぼしているかを検討した。

方法と材料

1) 試薬

ブラヂキニン¹⁰はペプチド研究所(大阪)、ソジウムニトロプルシッド(以下SNP)はシグマ(St Louis, MO, USA)、ACEはコスモバイオ(大阪)、インドメタシンとエナラプリラト原末はメルク社(Rahway, NJ, USA)、カプトプリル原末は三共製薬(東京)のものを使用した。また、培養液はクラボウ社製EBMあるいはEGM・UV培地(大阪)を、培養液に添加した子牛血清はギブコ社(Grand Island, NY, USA)のものを使用した。

2) 細胞培養と実験

ヒト臍帯静脈よりJaffeら¹⁰⁾の変法によりトリプシンを用いて内皮細胞を剥離し、EGM・UV培地+5%子牛血清で継代培養した。培養条件は、37℃、5%CO₂+95%air、飽和水蒸気下とした。細胞がコンフルエントになるまで約一週間を要し、二日毎に培養液を交換した。培養細胞が石垣状配列を呈し、さらに酵素抗体法染色によりfactor VIIを確認して内皮細胞であると同定した。

(図1 A, B)

また実験に際しては、内皮細胞を培養フラスコよりトリプシンを用いて剥離し、コニング社製のマルチ・プレートに植えた。コンフルエントになったことを確認したのち各wellを500 μlの新しい培養液で1時間preincubationし、一定濃度の試薬を含む1000 μlの同培養液に交換してincubationした。incubation後、培養液を一定時間後に回収し、エンドセリン測定時まで-70℃で保存した。プレートごとに上記の試薬を含まないwellを設けてコントロールとした。また、実験には継代3から10世代までの細胞を用いた。

3) エンドセリン測定と検定

アマシャム社製のEndothelin 1-21 specific [¹²⁵I]assay system (Buckinghamshire, UK)を用いて、培養液中のエンドセリンを直接ラジオイムノアッセイ法で測定した。本法の測定感度は0.5 fmol/tubeであり、intraassay variationは4.2%、interassay variationは12.5%であった。また、利用した抗体の交差性は、合成

ET-1に100%、合成ET-2に144%、合成ET-3に52%、
またbig ET-1には0.4%であった。

数値は、Mean±SEMで表し、有意差検定は、
一元配置分散分析法で解析し、 $P<0.05$ を有意と
した。

結果

1)1%,5%,10%の子牛血清は、無血清で培養した
基礎分泌に比べて、エンドセリンの分泌を3時
間後および6時間後に時間と濃度依存性に促進
させたが、24時間後には分泌刺激効果を示さな
かった(図2)。

2)5%の子牛血清刺激の存在する培養液中で、エ
ナラプリラト 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} Mとカプトプリル
 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} Mは、6時間後にエンドセリンの
分泌を濃度依存性に抑制した(エナラプリラト
はコントロールに比較し、それぞれ 65 ± 4 , $45\pm$
 3 , $34\pm5\%$, $P<0.001$; $n=6$: カプトプリルはコ
ントロールに比較し、それぞれ 57 ± 3 , 30 ± 3 ,
 $29\pm4\%$, $P<0.001$; $n=6$)。しかし、血清を含ま
ない培養液中では、両ACE阻害薬はエンドセリ

ンの分泌を抑制しなかった(図3A,B)。

3)血清を含まない培養液中にアンジオテンシン
II 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} Mを加えたところ、6時間後エ
ンドセリンの分泌にほとんど影響をおよぼさな
かった。また、培養系の内因性アンジオテンシ
ンIIの産生を高める目的でACE 0.1,1,10mUを同
様に培養液中加入したが、エンドセリン分泌に
ほとんど影響をおよぼさなかった。

4)ACE阻害薬により分解が抑制されるブラデキ
ニン 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} Mを血清を含まない培養液
中加入すると、6時間後エンドセリンの分泌は
軽度抑制された(コントロールに比較して、そ
れぞれ 93 ± 4 , 81 ± 3 , $81\pm4\%$, $P<0.05$; $n=6$)。
このブラデキニンのエンドセリン分泌抑制効果
は、5%の子牛血清刺激を含む培養液中ではさら
に増強された(コントロールに比較して、それ
ぞれ 74 ± 4 , 63 ± 6 , $43\pm6\%$, $P<0.001$; $n=6$)
(図4)。

5)ブラデキニンにより産生が促進されると考え
られている内皮細胞由来血管拡張物質(EDRF)と

同様の作用機序を有すると考えられるニトロプロシッド 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} Mを5%の子牛血清刺激を含む培養液に加えたところ、6時間後のエンドセリン分泌を抑制した(コントロールに比較して、それぞれ 91 ± 5 、 68 ± 1 、 $55 \pm 4\%$ 、 $P < 0.001$; $n=6$)(図5)。

6)内皮細胞からのプロスタノイド産生を抑制するため、5%の子牛血清刺激を含む培養液に 10μ Mのインドメタシンを加えたところ、6時間後のエンドセリン分泌にほとんど影響をおよぼさなかった。

考察

SH基を持つカプトプリルおよびSH基を持たないエナラプリルの両ACE阻害薬は、培養血管内皮細胞からのエンドセリン分泌を濃度依存性に抑制した(図3)。この効果は子牛血清の添加によるエンドセリン分泌刺激状態で明らかとなった。本実験からは、どのような機序で子牛血清がエンドセリン分泌を刺激したかは明らかではない。しかし、子牛血清の添加によりもたら

された何らかのエンドセリン分泌刺激物質の効果をACE阻害薬が抑制した可能性や、逆に何らかのエンドセリン分泌抑制物質の効果を増強した可能性が考えられる。培養血管内皮細胞でアンジオテンシンIIがエンドセリン分泌を刺激するかどうかに関しては意見の一致をみていないが^{11, 12)}、血管内皮細胞培養系でも組織レニン・アンジオテンシン系が細胞膜に存在し、培養液中にはアンジオテンシンIIが産生されていることが知られている^{6, 7)}。従って、ACE阻害薬が培養内皮細胞膜上でアンジオテンシンIIの産生を抑制し、そのためエンドセリン分泌が抑制された可能性を推測し、培養液中に外因性のアンジオテンシンIIを加えたところ、エンドセリン分泌の刺激効果は認められなかった。また、子牛血清中にはACEが存在することが知られており¹³⁾、内皮細胞からの内因性のアンジオテンシンIIの産生が子牛血清中のACEにより増強されてエンドセリン分泌を刺激した可能性も考えられた。しかし、内因性のアンジオテンシンIIの

産生を高める目的で精製されたACEを培養液中に加えたがエンドセリン分泌は刺激されなかった。これらの結果から、本研究で観察したACE阻害薬によるエンドセリン分泌抑制効果は、同阻害薬によって培養細胞上でアンジオテンシンIIの産生が抑制されたことによるとは考えにくいと思われた。

一方、ACE阻害薬はin vivo やin vitroにおいてブラヂキニンの分解を抑制し、その作用を増強することが知られている¹⁴⁾。そこで内皮細胞培養系でACE阻害薬によるブラヂキニンの増加がエンドセリン分泌抑制に関与した可能性を考え、ブラヂキニンのエンドセリン分泌におよぼす効果を検討した。ブラヂキニンは、濃度依存性にエンドセリンの分泌を抑制し、血清刺激下で、さらに抑制効果が著明になった(図4)。この結果は、ACE阻害薬によるエンドセリン分泌抑制機序の一部に、同薬による内皮細胞上のブラヂキニンの効果の増強作用が関係している可能性を間接的に示していると思われる。

内皮細胞培養系でブラヂキニンが産生されているかどうかは明らかでないが、摘出した血管に組織カリクレインが存在することや¹⁵⁾、血清より供給されたブラヂキニノ-ゲンを培養内皮細胞が細胞内に取り込むこと¹⁶⁾が報告されている。さらに最近、Wiemerら¹⁷⁾は、ヒト内皮細胞培養系でACE阻害薬がプロスタサイクリンやEDRFの分泌を増加させることを示し、この作用がブラヂキニンのアンタゴニストで抑制されることを報告した。これらの事実は、内皮細胞培養系でもブラヂキニンが産生されうること示唆している。従って、ACE阻害薬によるエンドセリン分泌の抑制効果は、子牛血清からブラヂキニノ-ゲンが供給され、さらにACE阻害薬によりブラヂキニンの分解抑制が増大したため観察されたものと考えられた。

つぎに、ブラヂキニンが、どのような機序でエンドセリンの分泌を抑制したかを検討した。ブラヂキニンは、内皮細胞に作用してEDRFやプロスタノイドの産生を刺激することが知られ

ている^{18, 19)}。また、内皮細胞より分泌されるEDRFはautocrineやparacrineとして内皮細胞自身にも作用し、同細胞内でcyclic GMPを産生することが知られている²⁰⁾。そこで、EDRFと同じく内皮細胞内のcyclic GMPの増加をもたらすニトロプルシッド²¹⁾を培養液中に加えたところ、エンドセリン分泌の抑制が観察された(図5)。また、内皮細胞からのプロスタノイドの産生を抑制すると考えられるインドメタシンの添加は、培養内皮細胞のエンドセリンの分泌になんら影響を与えず、培養内皮細胞から産生されるプロスタノイドが、エンドセリン分泌を調節している可能性は少ないものと考えられた。これらのことから、ACE阻害薬により内皮細胞で増加したブラヂキニンは、EDRFの産生を増強させて内皮細胞内のcyclic GMPの増加をもたらし、その結果エンドセリンの分泌を抑制した可能性が推測される。この仮説は、還流血管モデルにおいてEDRFの前駆物質と考えられるL-arginineの競合阻害物質であるN-monomethyl-L-arg

inineでEDRFの産生を抑制するとエンドセリンの分泌が亢進することや²²⁾、培養内皮細胞でEDRFのセカンド・メッセンジャーであるcyclicGMPの産生をオキシヘモグロビンを用いて抑制するとエンドセリンの分泌が亢進するというCocksら²³⁾の報告に一致するものと思われる。

近年、内皮細胞自身が血管拡張や収縮に関連する物質、また凝血や抗凝血に関連する物質など種々の因子を分泌することが知られるようになった。内皮細胞は、これら相反する性質を持つ生理活性物質の分泌を微妙に調節し、局所の血流調節などに重要な役割を演じているものと考えられる。エンドセリンが、血管ト-ヌスの調節や動脈硬化の進展に重要な役割をになっているとすれば、本研究で明らかになったACE阻害薬によるエンドセリン分泌抑制作用は、同薬が持っていると考えられる血管拡張効果あるいは血管肥厚の抑制効果^{9, 24)}の一端を説明するものと考えられる。

結語

培養ヒト血管内皮細胞を用いてACE阻害薬やACEに関連する種々の血管作動性物質のエンドセリン分泌におよぼす効果を検討した。

1)1,5,10%の子牛血清の添加は、3時間ならびに6時間の培養後に濃度と時間依存性にエンドセリン分泌を亢進させた。しかし、24時間後に明らかな刺激効果を示さなかった。

2)5%の子牛血清の存在する培養液中で、6時間後エナラプリラトおよびカプトプリルは濃度依存性にエンドセリンの分泌を抑制した。この抑制効果は、子牛血清を含まない培養液中では認められなかった。

3)子牛血清を含まない培養液中で、アンジオテンシンIIおよびACEは、エンドセリンの分泌をほとんど刺激しなかった。

4)ブラヂキニンは、エンドセリンの分泌を軽度抑制し、この抑制効果は5%の子牛血清の存在下で増強された。

5)EDRFのアナログとして用いたニトロプルシッ

ドは、エンドセリンの分泌を濃度依存性に抑制した。

6)プロスタノイドの産生を抑制するインドメタシンは、エンドセリンの分泌に影響をおよぼさなかった。

本研究は、ACE阻害薬がエンドセリンの分泌を抑制することを初めて明らかにした。さらにこの抑制機序にACE阻害薬によるブラヂキニンの効果の増強やEDRFが関与している可能性を間接的に示唆した。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました佐藤誠教授および平盛勝彦教授に深謝いたします。本研究の遂行のため、終始適切なる助言と惜しみない御協力をいただいた中村元行講師ならびに第二内科教室の諸兄、さらに本研究を御理解いただき実験当初、培養室や設備を提供していただいた第二病理、里館良一教授に感謝の意を表します。

本研究の一部は、圭陵会個人研究助成(No.82)によった。

文献

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415, 1988.
- 2) Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., et al.: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS letters* 238, 249-252, 1988.
- 3) Takagi, Y., Fukase, M., Takata, S., et al.: Autocrine effect of endothelin on DNA synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 537-543, 1990.
- 4) Saito, Y., Nakao, K., Mukoyama, M., et al.: Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 322, 205, 1990.
- 5) Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., et al.: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 325, 997-1001, 1991.
- 6) Tang, S., Stevenson, L. and Dzau, V. J.: Endothelial renin-angiotensin pathway. *Circ. Res.* 66, 103-108, 1990.
- 7) Kifor, I. and Dzau, V. J.: Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ. Res.* 60, 422-428, 1987.
- 8) Clozel, M., Kuhn, H. and Hefti, F.: Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of

hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension* 16, 532-540, 1990.

9) Powell, J. S., Clozel, J., Muller, R. K. M., et al. : Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245, 186-188, 1989.

10) Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., et al. : Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52, 2745-2756, 1973.

11) Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., et al. : Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 93-100, 1989.

12) Hieda, H. S. and Gomez-Sanchez, C. E. : Hypoxia increases endothelin release in bovine endothelial cells in culture, but epinephrine, norepinephrine, serotonin, histamine and angiotensin II do not. *Life Sci.* 47, 247-251, 1990.

13) Bagby, S. P. and Holden, W. E. : An in vitro system for study of effects of angiotensin I on cultured endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 23, 279-285, 1989.

14) Johnson, A. R. and Erdös, E. G. : Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture. *J. Clin. Invest.* 59, 684-695, 1977.

15) Nolly, H., Scicli, A. G., Scicli, G., et al. : Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circ. Res.* 56, 816-821, 1985.

16) Van Iwaarden, F., De Groot, P. G., Sixma, J. J., et

al. : High-molecular weight kininogen is present in cultured human endothelial cells: localization, isolation, and characterization. *Blood.* 71, 1268-1276, 1988.

17) Wiemer, G., Schölkens, B. A., Becker, R. H. A. et al. : Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium derived bradykinin. *Hypertension.* 18, 558-563, 1991.

18) Whorton, A. R., Young, S. L., Data, S. L., et al. : Mechanism of bradykinin-stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells. *Biochimica Biophysica Acta.* 712, 79-87, 1982.

19) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S. : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524-526, 1987.

20) Martin, W., White, D. G. and Henderson, A. H. : Endothelium-derived relaxing factor and atriopeptin II elevate cyclic GMP levels in pig aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 93, 229-239, 1988.

21) Ganz, P., Davies, P. F., Leopold, J. A., et al. : Short and long-term interactions of endothelium and vascular smooth muscle in coculture: effects on cyclic GMP production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 3552-3556, 1986.

22) Boulanger, C. and Lüscher, T. F. : Release of endothelin from the porcine aorta. *J. Clin. Invest.* 85, 587-590, 1990.

23)Cocks,T.M.,Malta,E.,King,S.J.,et al.:
Oxyhaemoglobin increases the production of
endothelin-1 by endothelial cells. Eur.J.
Pharmacol. 196,177-182,1991.

24)Unger,T.and Gohlke,P.:Tissue renin-
angiotensin systems in the heart and vasculature:
possible involvement in the cardiovascular
action of converting enzyme inhibitors. Am.J.
Cardiol. 65,3I-10I,1990.

FIGURE LEGENDS

FIG 1

Phase-contrast microscopic (A) and light microscopic (B) appearance of the cultured human umbilical endothelial cells monolayer one week after subseeding. The cobble stone morphology (A) and the factor VIII related surface antigen (B) were demonstrated in the picture.

FIG 2

Accumulation of endothelin in medium containing newborn calf serum (0%, ○; 1%, △; 5%, ●; 10%, ▲) at 3, 6, and 24 hours after incubation with cultured human endothelial cells. Mean ± SEM (n = 6).

FIG 3

Inhibitory effect of angiotensin converting enzyme inhibitors enalaprilat (A) and captopril (B) on endothelin secretion from cultured human endothelial cells in medium containing 5% newborn calf serum (●) and serum-free (○) after 6 hours incubation. Mean ± SEM (n = 6).

FIG 4

Inhibitory effect of bradykinin on endothelin secretion from cultured human endothelial cells in medium containing 5% newborn calf serum (●) and serum-free (○) after 6 hours incubation. The data was expressed as percentage of the each control. Mean \pm SEM (n = 6).

FIG 5

Inhibitory effect of nitroprusside on endothelin secretion from cultured human endothelial cells in medium containing 5% newborn calf serum after 6 hours incubation. The data was expressed as percentage of the control. Mean \pm SEM (n = 6).



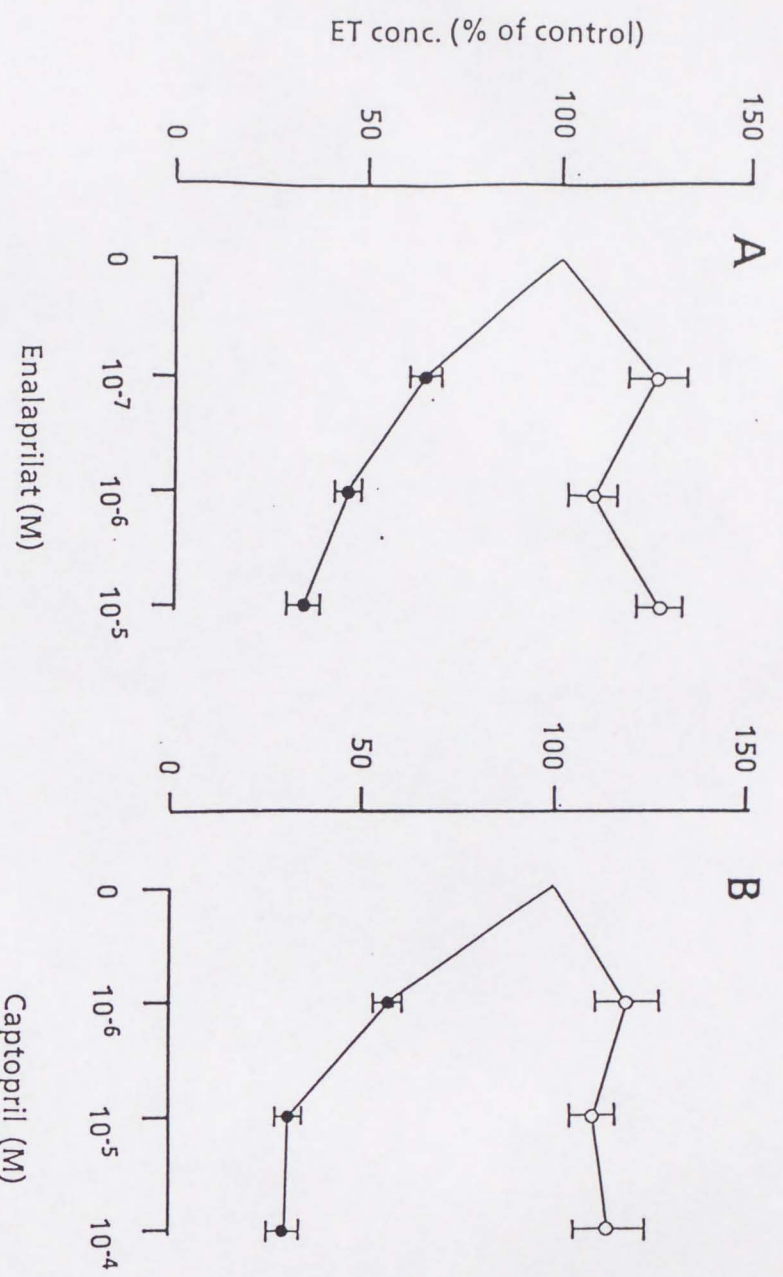
図1 培養細胞

(A)

大

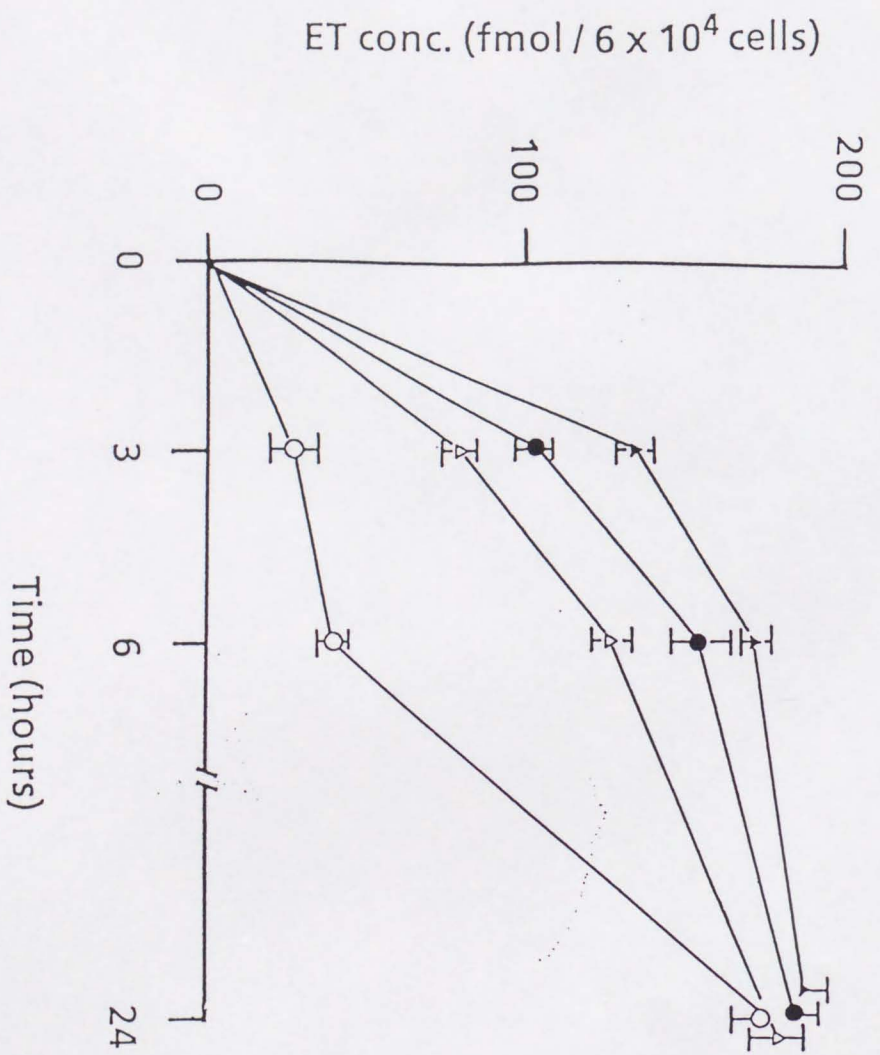
(B)

大



天

Figure 2



天

