

エストロゲンの抗動脈硬化作用と  
その機序に関する研究

秋 下 雅 弘

①

エストロゲンの抗動脈硬化作用と  
その機序に関する研究

秋 下 雅 弘

## 目次

1. 目的	1
2. 方法	3
3. 結果	10
4. 考察	21
5. 文献	28



## 1. 目的

動脈硬化性疾患の発症頻度は閉経前の女性では男性よりきわめて少ないが、閉経後増加し70歳以上になるとほぼ男性のレベルに達すること<sup>1</sup>、また両側卵巣摘除術による人工的閉経により動脈硬化性疾患の頻度が増加すること<sup>2</sup>が知られている。それに対しエストロゲン補充療法は閉経後女性の冠動脈疾患を約1/2に減少させることが報告されている<sup>2-4</sup>。さらにウサギ、サルなどの動物を用いた高コレステロール負荷による実験的動脈硬化においてもエストロゲンは抑制効果を示すことが報告されている<sup>5-7</sup>。これらの疫学的・実験的観察からエストロゲンは動脈硬化抑制作用を有すると考えられているが、その作用機序は未だ明らかにされていない。

エストロゲンに脂質代謝を改善する作用が存在することが多くの報告から明らかである<sup>5,6,8-10</sup>。すなわちエストロゲンは血中LDL-コレステロールを減少させ、逆にHDL-コレステロールを増加させることが知られている。一方、血管構成細胞である血管内皮細胞(ECs)<sup>11</sup>および血管平滑筋細胞(VSMCs)<sup>12-14</sup>にエストロゲン受容体が存在することから、エストロゲンの血管壁に対する直接作用が存在することが推測される。エストロゲンの直接作用として、これまでに内皮非依存性血管拡張作用<sup>15,16</sup>すなわち血管平滑筋に対する直接の弛緩作用を有すること、および内皮依存性血管拡張作用<sup>17-19</sup>すなわち内皮由来弛緩因子の産生刺激を介した拡張作用を有することが報告されている。これらの血管拡張作用の機序の一部として、カルシウム拮抗作用<sup>15,16</sup>、prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)産生促進作用<sup>20,21</sup>、nitric oxide (NO)産生促進作用<sup>22</sup>が考えられるが、エストロゲンの抗動脈硬化作用を説明するにはまだ不十分であると思われる。

これらの報告を背景として、エストロゲンの血管に対する直接作用を明らかにする目的で研究を行った。エストロゲンの作用としてまず(a)カフ被覆によるラット動脈内膜肥厚に対する効果をみた。この実験を行った理由は、従来の動物モデルでの報告<sup>5-7</sup>が脂質代謝の関与を中心としたものであったのに対し、このモデルでは脂質代謝の関与は否定的であると考えられ、従ってエストロゲンの血管に対する直接作用を検討するの

に適していると考えたからである。続いてエストロゲンによる内膜肥厚抑制作用の機序について検討する目的で、(b) VSMCsの遊走ならびに増殖に対するエストロゲンの影響を培養細胞を用いて検討した。VSMCsの遊走および増殖は内膜肥厚が起こる機序として最も基本的なものであり、動脈硬化の発症・進展において重要な過程である<sup>23</sup>と考えられている。エストロゲンによるVSMCsの遊走に対する作用についてはこれまで報告がなく、また増殖に対する作用については報告があるものの、用いたエストロゲンが高濃度であることなど問題があった。本研究ではさらに培養細胞ならびに卵巣摘除ラットを用いて、(c) エストロゲンによる endothelin-1 (ET-1) の産生調節作用について検討した。ET-1は血管収縮因子<sup>24</sup>であるばかりでなく、VSMCsの増殖促進作用<sup>25-27</sup>も有することが知られ、動脈硬化の発症・進展における関与も示唆されている。また(d) プロトオンコジーンのひとつである *c-fos* の血管壁における発現に対するエストロゲンの作用についても検討を行った。*c-fos*は種々の増殖因子による刺激で発現誘導され、転写因子として細胞増殖の制御に関わっているとされる<sup>28,29</sup>。エストロゲンにより血管壁におけるET-1および*c-fos*の発現が影響されるかどうかについてはこれまで報告がない。



## 2. 方法

### 2.1. 化学物質

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA) より、fetal bovine serum (FBS) は ICN Biomedicals Japan (大阪) より購入した。bovine serum albumin (BSA)、trichloroacetic acid (TCA)、Triton X-100 は和光純薬 (大阪) より購入した。phenol red-free DMEM、ET-1、ヒト basic fibroblast growth factor (bFGF)、indomethacin、NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)、methylene blue、17 $\beta$ -estradiol (E2)、17 $\alpha$ -estradiol、progesterone、testosterone は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。ヒト platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) は Genzyme (Cambridge, MA, USA) より、プタ transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。 $[\alpha$ -32P]-dCTP、 $[^3\text{H}]$ -thymidine、 $[^3\text{H}]$ 2-Deoxy-D-glucose (DOG) は NEN Research Products (Boston, MA, USA) より購入した。

### 2.2. 動物

日本生物材料センター (東京) より購入した Wistar 系雌性および雄性ラットを用いた。ラットは空調 (約 22°C)、照明 (12 時間 on, 12 時間 off) 設備の整った部屋で飼育した。

### 2.3. 卵巣摘除およびエストロゲン補充

8 週齢の雌ラットを sham operation 群 (Sham)、両側の卵巣を摘除する群 (OVX)、卵巣摘除にエストロゲンを補充する群 (OVX+E) の 3 群に分けた。実験により、同週齢の雄ラット (Male) を加えた。手術はエーテル麻酔下で行い、エストロゲン補充は 1 週間の回復期間の後、corn oil で希釈した estradiol dipropionate (帝国臓器、東京) を 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  週一回筋注した。他の群には corn oil のみを投与した。内膜肥厚の実験を除き、手術後 3 週で実験に用いた。

#### 2.4. 細胞培養

本研究では、ウシ頸動脈より物理的剥離により得られた ECs<sup>30</sup>、ラット大動脈中膜より酵素法により得られた VSMCs<sup>13</sup> の他、株化細胞としてラット胎児大動脈中膜由来平滑筋細胞である A10<sup>31</sup>、ヒト乳癌由来細胞である MCF-7<sup>32</sup> を用いた。すべての細胞は 10% FBS + DMEM にて実験まで培養した。また E2 および他の性ステロイドを用いる実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去した FBS (DCC-FBS) および弱いエストロゲン作用を有する phenol red を含まない DMEM (phenol red-free DMEM) を用いた。

#### 2.5. ノーザンブロット解析

RNA は、組織または細胞から guanidinium thiocyanate 法<sup>33</sup> により抽出した。RNA は 1% アガロースゲルにて泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーした。そして、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  でラベルしたラット ET-1 (東京大学医学部第 3 内科、前村氏より提供)、ヒト *c-fos* (宝酒造、京都) もしくはヒト  $\beta\text{-actin}$  (和光純薬、大阪) cDNA プロローブと 16 時間ハイブリダイズした。ラベルは、ランダムプライム法 (Random Primed DNA Labeling Kit; Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) により行った。

#### 2.6. ET-1 の ELISA 法による定量

ECs の培養上清中、大動脈組織中および血漿中の ET-1 濃度は、高感度サンドイッチ ELISA キット (武田薬品工業、東京)<sup>34</sup> を用いて測定した。培養上清は直接、また組織抽出液および血漿は Sep-Pak C18 (Water Associates, Milford, MA) にて抽出した後、ELISA キットでアッセイした。このシステムの感度は 2.0 pg/ml (0.5 pg/ml plasma) で、ET-2, ET-3, big ET-1 との交差反応性はそれぞれ 160%, 0.21%, 0.16% である。

#### 2.7. カフ被覆による大腿動脈内膜肥厚モデル



まず8週齢の雄ラットを用いて、内膜肥厚度の経時的变化をみた。エーテル麻酔下に左大腿動脈を露出し、長さ5 mm、内径1.14 mm、外径1.57 mmのポリエチレンカフ(PE-160; Becton Dickinson, Parsippany, NJ, USA)で非閉塞性に被覆した。手術後1週から4週(各n=7-9)で脱血により屠殺し、大腿動脈をカフと共に摘出した。尚、各週で動脈にカフを被覆しないsham手術を2-3匹行った。ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成、横断面でElastica van Gieson染色を行って内膜肥厚度を計測した。内膜肥厚度は、computer digitizerを用いて中膜の面積に対する内膜の面積の比(I/M ratio)として計算した。

次に内膜肥厚度の性差およびエストロゲンの影響を検討するために、Sham、OVX、OVX+E、Maleの各群(各n=7)について内膜肥厚度をみた。卵巣摘除あるいはsham operationの1週後、カフ被覆を行い、その2週後に大腿動脈を摘出した。同時に、16時間絶食後の血清脂質(総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド)、血漿estradiol濃度を測定した。また屠殺の前日、覚醒下で収縮期血圧をtail-cuff法(UR-1000/UR-5000, Ueda Inc., 東京)により計測した。

## 2.8. VSMCsの遊走

VSMCsの遊走は、96-well microchemotaxis chamber (Neuro Probe Inc., Cabin John, MD, USA)と径5  $\mu$ mのmicropore filter (Neuro Probe Inc.)を用いたBoyden's chamber変法<sup>35</sup>により検討した。まず雄ラット由来VSMCsを、 $5.0 \times 10^5$  cells/mlの濃度で0.1% DCC-FBS + phenol red-free DMEMに浮遊させた。このVSMCs浮遊液(225  $\mu$ l)をchamberの上層に入れた。下層には、10% DCC-FBS + phenol red-free DMEMに種々の濃度のE2(0.1-100 nM)またはvehicle (ethanol)を添加して、35  $\mu$ l入れた。chamberを37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で4時間incubateした。filterを取り外し、上面に付着したVSMCsを剥ぎ落とした。filterはmethanol固定後、Diff-Quick染色液(Green Cross Co., 大阪)にて染色した。filterの下面側に遊走した細胞を鏡検下でカウントし、5視野の平均をとり(cells/HPF)、遊走能の指標とした。



## 2.9. VSMCs の増殖

増殖については、DNA 合成の指標としての [ $^3\text{H}$ ]-thymidine 取り込み<sup>36</sup> と細胞数の算定により検討した。

[ $^3\text{H}$ ]-thymidine 取り込み；細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml の濃度で浮遊させ、0.5 ml を 24-well plate に播いた。細胞が confluent に達したところで、phenol red-free DMEM に置き換え、増殖停止させた。24 時間後、検討する試薬を含む phenol red-free DMEM に置き換え、同時に [ $^3\text{H}$ ]-thymidine  $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  を添加し、さらに 24 時間培養した。氷冷した phosphate-buffered saline (PBS) にて 2 回洗浄後、5% TCA 添加し  $4^\circ\text{C}$ 、20 分間留置。その後、5% TCA 2 回、PBS 1 回洗浄、NaOH  $60^\circ\text{C}$ 、1 時間 にて溶解し、液体シンチレーションカウンター (LSC-1000；アロカ、東京) で取り込まれた [ $^3\text{H}$ ]-thymidine の放射活性を計測した。

細胞数算定；細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml の濃度で浮遊させ、1.0 ml を 12-well plate に播いた。細胞が confluent に達したところで、phenol red-free DMEM に置き換え、24 時間増殖停止させた。5% DCC-FBS + phenol red-free DMEM に E2 (1, 10, 100 nM) または vehicle (ethanol) を添加したものに置き換え、さらに 24-48 時間培養した。0, 24, 48 時間の各時間で、細胞を 0.25% trypsin-0.02% EDTA で浮遊させ、Coulter counter を用いて細胞数をカウントした。

## 2.10. VSMCs の細胞障害

細胞障害の検討は、細胞に取り込まれた [ $^3\text{H}$ ]2-DOG の細胞外への遊離率として測定した<sup>36</sup>。24-well plate に播き confluent に達した A10 細胞に、[ $^3\text{H}$ ]2-DOG ( $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) を添加し  $37^\circ\text{C}$ 、18 時間 incubate した。0.5% BSA + Hanks' balanced salt solution にて 2 回洗浄した後、vehicle (ethanol)、E2 (1 nM, 100 nM) もしくは 0.2% Triton X-100 を含む 0.5% BSA + Hanks' balanced salt solution に置き換え  $37^\circ\text{C}$ 、2 時間 incubate した。培養上清を回収し、細胞は 0.5 N NaOH にて溶解、両者の放射活性を液体シンチレーションカウンター

で測定した。VSMCs からの特異的  $[3H]2\text{-DOG}$  の遊離率は、 $100 \times (A - C) / (B - C)$  として計算した (A; E2 もしくは Triton X-100 処理群の培養上清のカウント、B; E2 もしくは Triton X-100 処理群の培養上清と細胞溶解液のカウントの和、C; 対照群の培養上清のカウント)。

#### 2.1.1. ECs による ET-1 mRNA の発現および培養上清中への ET-1 分泌

confluent に達した ECs を、E2 (10 nM) もしくは ethanol を添加した phenol-red (-) DMEM で 24 時間培養した。その後 TGF- $\beta$ 1 2.0 ng/ml もしくは vehicle を添加し、4 時間後に RNA を抽出して、ノーザンブロット解析を行った。4 時間後でみたのは、TGF- $\beta$ 1 による ET-1 mRNA の発現誘導は、刺激後 2-6 時間でピークを示すからである<sup>37</sup>。

次にタンパクレベルでの検討を行った。24-well plate に播いた ECs が confluent に達した時点で、E2 (10 nM) もしくは ethanol を添加した phenol-red (-) DMEM に置き換え、24 時間培養した。TGF- $\beta$ 1 (0, 0.5, 2.0 ng/ml) を添加しさらに 24 時間培養し、上清中の ET-1 濃度を ELISA で測定した。

#### 2.1.2. 血中 ET-1 濃度の性差および metabolic clearance rate (MCR)

Sham、OVX、OVX+E (各 n=7)、Male (n=5) の 4 群のラットから、前日腹部大動脈に留置しておいたカテーテル (PE-50) を通して覚醒下に採血した。血液は、EDTA・2Na と aprotinin 入りの試験管に取り、血漿を遠心分離した後 ET-1 の測定まで -80°C に保存した。

次に ET-1 の血中濃度の差が産生に由来するものであるかどうかを検討するため、ET-1 の metabolic clearance rate (MCR) をみた。MCR の測定は大内らの方法<sup>38</sup>に従った。Sham、OVX、OVX+E (各 n=5)、Male (n=4) の 4 群のラットを用いた。エーテル麻酔下にカテーテル (PE-50) を腹部大動脈と頸静脈に留置し、後頸部に固定した。翌日ラットを一匹毎プラスチックボックス中に入れ、動脈カテーテルをトランスデューサー (Statham P10EZ; Gould, Oxnard, CA, USA) に接続して平均血圧 (MABP) および心拍数



(HR) をモニターしながら実験を行った。このボックス中でラットは自由に前進、後退、回転することができる。まず MABP と HR が安定したところで、動脈カテーテルから 2 ml 採血した。このとき同時に、性の一致した別のラットから採血して 37°C に保温しておいた血液を静脈カテーテルより輸血した。続いて、0.1% BSA を含む PBS に溶解した ET-1 を 0.2 ng/kg/min の速度でマイクロインジェクションポンプ (CMA 100; Carnegie Medicin AB, Stockholm, Sweden) を用いて静脈内投与した。30 分後、ET-1 の投与速度を 0.6 ng/kg/min に増加してさらに 30 分投与した。それぞれ 30 分の投与最後に、2 ml の動脈採血とドナー血液の輸血を行った。各ラット 3 回分の血液について、上述したように血漿を分離し、ET-1 濃度の測定まで保存した。ET-1 の MCR は、ET-1 の投与速度を血漿 ET-1 濃度の上昇で除した数値として計算した。

### 2.1.3. 大動脈組織での ET-1 発現

Sham (n=7)、OVX (n=7)、OVX+E (n=6) の 3 群のラットから胸部大動脈を摘出し、内膜剥離後、液体窒素中で凍結した。組織中の ET-1 の抽出は Matsumoto らの方法<sup>39</sup>に従った。すなわち、1M 酢酸中でポリトロンホモジナイザーにて 60 秒間ホモジナイズした後、25,000g、30分遠心、上清を Sep-Pak C18 で抽出した。上清中の ET-1 濃度を測定し、タンパク量で補正した。タンパクは Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) で測定した。

さらに ET-1 発現の局在について検討するため、Sham、OVX、OVX+E の 3 群のラットから得られた胸部大動脈を内膜剥離後、ホルマリン固定パラフィン切片とし、streptavidin-biotin-peroxidase 法<sup>40</sup>により免疫染色を行った。ET-1 に対する抗体 (MCA ET-01 20 µg/ml; ヤマサ醤油、千葉)<sup>41</sup> もしくはコントロールとして正常マウス IgG を一次抗体として用いた。発色は 3,3'-diaminobenzidine 溶液 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) によった。

### 2.1.4. 組織での c-fos mRNA の発現

Sham、OVX、OVX+E の3群のラット（各n=5）から胸部大動脈および子宮を摘出し、液体窒素中で凍結した後 RNA を抽出した。total RNA 20  $\mu$ g を用いて *c-fos* のノーザンブロット解析を行った。

さらに ET-1 と *c-fos* 発現との関係について検討する目的で、Sham に対し MCR の実験と同様の方法で ET-1 の静脈内持続投与（0.2 ng/kg/min）を行い、経時的に（0, 30, 60, 120 分, 各n=3）胸部大動脈を摘出し、*c-fos* のノーザンブロット解析を行った。

#### 2.1 5. 動脈組織での DNA 合成

Sham（n=4）、OVX（n=5）、OVX+E（n=5）の3群のラットから胸部大動脈および左大腿動脈を摘出し、長さ 2-3 mm の切片を作成した。DMEM にて 24 時間培養後、さらに [ $^3$ H]-thymidine 1  $\mu$ Ci/ml を添加した DMEM 中で 48 時間培養した。組織を PBS で 3 回洗浄後、0.5 N NaOH, 60 $^{\circ}$ C, 16 時間にて溶解した。 [ $^3$ H] の放射活性を液体シンチレーションカウンター（LSC-1000）にて測定し、組織タンパク量で補正した。タンパクの定量は Bio-Rad protein assay kit により行った。大動脈については 4 切片、大腿動脈については 2 切片の平均を各個体の数値とした。

#### 2.1 6. 統計

本文および図表中の数値はすべて、mean  $\pm$  SEM で表した。データは one-factor ANOVA にて解析し、有意差検定は Newman-Keuls' test にて行った。p < 0.05 を有意とした。



### 3. 結果

#### 3.1. カフ被覆による大腿動脈内膜肥厚モデル

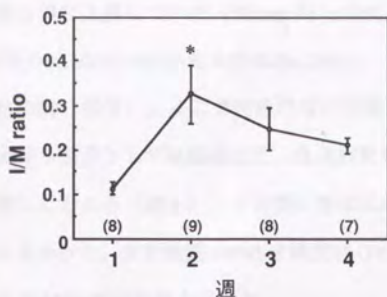


図1. カフ被覆によるラット大腿動脈内膜肥厚の経時的变化.

8週齢の雄ラットにカフ被覆を行い、1週-4週で内膜肥厚の程度を比較検討した。

mean ± SEM, n=( )

\*;  $p < 0.05$  vs 1週

I/M ratio; 中膜の面積に対する内膜の面積比

まず内膜肥厚の経時的变化をみたところ、I/M ratio は図1に示すように2週間でピークに達し、その後4週間まで徐々に減少する傾向がみられた。またカフ被覆を行わない場合には内膜肥厚は全くみられなかった。そこで内膜肥厚の性差およびエストロゲンの影響については2週間で検討を行った。

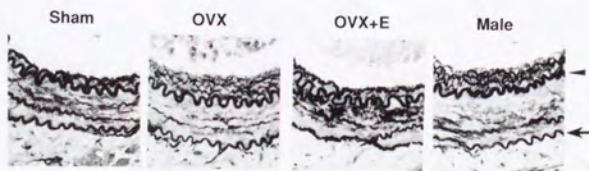


図2. カフ被覆によるラット大腿動脈内膜肥厚像 (性差およびエストロゲンの影響)

Sham, OVX, OVX+E, Male の4群のラットにカフ被覆を行い、2週間後に動脈を摘出、横断面標本でElastica van Gieson染色を行った。各群の代表的な鏡検像を示す。(X 200)

◄; 内弾性板, ◄◄; 外弾性板

図2に示すように、内膜肥厚はOVXおよびMaleでSham、OVX+Eより高度であり、I/M ratioは、MaleおよびOVXでSham、OVX+Eの約2倍に上昇していた(Sham;  $0.17 \pm 0.04$ , OVX;  $0.41 \pm 0.07$ , OVX+E;  $0.18 \pm 0.04$ , Male;  $0.38 \pm 0.08$ , 図3)。ここで内膜肥厚に影響を与え得る因子として収縮期血圧、血清脂質を比較したところ(表1)、4群間に差は認められなかった。また血漿 estradiol 濃度はOVXおよびMaleでは低値を示した。

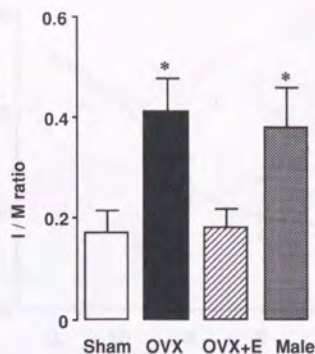


図3. ラット大腿動脈内膜肥厚における性差 Sham、OVX、OVX+E、Maleの4群のラットに対してカフ被覆を行い、2週間後に内膜肥厚度を比較した。

mean ± SEM, n=7, \*;  $p < 0.05$  vs Sham & OVX

I/M ratio; 中膜の面積に対する内膜の面積比

表1. ラット内膜肥厚モデルにおける収縮期血圧(SBP)、血清脂質および血漿 estradiol (E2) 濃度

	SBP (mmHg)	T.chol (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)	E2 (pg/ml)
Sham	138±3	72.3±2.3	52.0±3.6	27.6±2.6	36.2±7.3
OVX	135±3	79.4±4.2	56.8±3.2	28.0±3.0	11.3±1.6 <sup>a</sup>
OVX+E	139±3	80.3±3.7	55.3±4.6	22.7±1.7	22.3±4.8
Male	140±2	68.4±2.3	56.9±2.9	26.4±1.5	7.7±0.8 <sup>a</sup>

表中の数値は mean ± SEM. a;  $p < 0.05$  vs Sham.

SBP; 収縮期血圧, T.chol; 総コレステロール, HDL-C; HDL-コレステロール  
TG; トリグリセリド, E2; estradiol



### 3.2. VSMCs の遊走

図4に示すように、E2は濃度依存性に雄ラット由来 VSMCs の遊走を抑制した。濃度としては、1 nM 以上で有意であり、ラットの生理的濃度（表1から考えると0.1 nM 前後）をやや上回る。

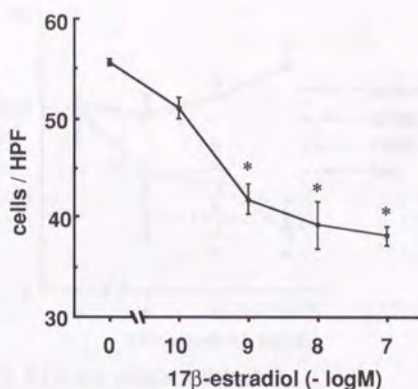


図4. E2 の VSMCs 遊走抑制作用.

### 3.3. VSMCs の増殖

まず雄ラット由来 VSMCs を用いて、5% DCC-FBS と種々の濃度の E2 を同時添加し、DNA 合成に対する影響をみた。VSMCs による DNA 合成は E2 により濃度依存性に抑制された（図5）。有意であった濃度は0.01 nM 以上であり、生理的濃度でも効果を認めた。

Boyden's chamber 変法により、10%DCC-FBS の刺激による VSMCs の遊走に対する種々の濃度の 17β-estradiol の影響を検討した。VSMCs は雄ラット大動脈由来のものを用い、17β-estradiol は10%DCC-FBS と共に下層に添加した。  
mean ± SEM, n=3, \*; P < 0.05 vs control

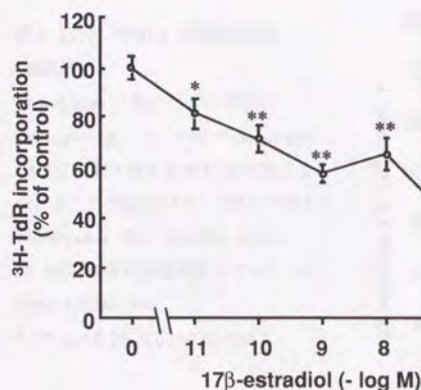


図5. E2 の VSMCs 増殖抑制作用

- 濃度依存性 -

VSMCs は雄ラット大動脈由来のものを用い、24 時間増殖停止後、5%DCC-FBS と同時に種々の濃度の 17β-estradiol を添加し、24 時間での  $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みを検討した。

mean ± SEM, n=8

\*, \*\*; p < 0.05, 0.01 vs control

次に E2 による抑制作用が細胞の種類により異なるかどうかを検討した。3 種類の VSMCs すなわち雄ラット大動脈由来細胞、雌ラット大動脈由来細胞、A10 細胞に加え

て、E2 による増殖刺激作用が知られている乳癌由来細胞の MCF-7<sup>32</sup> を用いて、DNA 合成に対する E2 の作用を比較した。3 種類の VSMCs いずれについても E2 は抑制作用を示したが、MCF-7 については抑制作用はみられず、100 nM で有意に DNA 合成は亢進していた (図 6)。

DNA 合成に対する抑制作用が細胞数の変化と関連することを確認する目的で A10 細胞を用いて細胞数についての検討を行った。5% DCC-FBS の刺激により細胞数は増加したが、E2 の添加によりその増加は濃度依存性に抑制された (図 7)。

図 7. E2 の VSMCs 増殖抑制作用

- 細胞数 -

12-well plate に播いた A10 細胞が confluent に達したところで phenol-red (-) DMEM に置き換え増殖を 24 時間停止した。そして 5%DCC-FBS と種々の濃度の 17 $\beta$ -estradiol (E2) を同時に添加し、24-48 時間後の細胞数をカウントした。mean  $\pm$  SEM, n=4

\*, \*\*; p < 0.05, 0.01 vs control

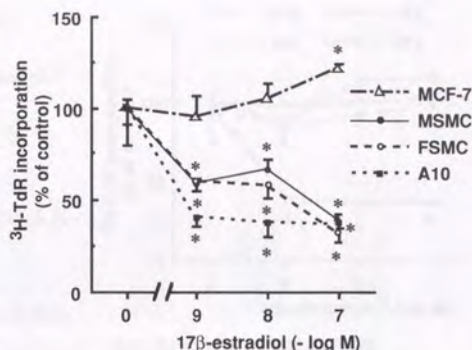
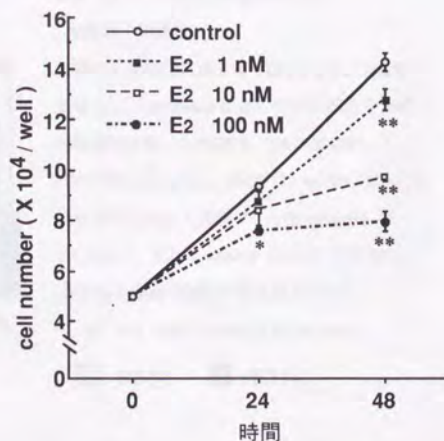


図 6. E2 による VSMCs 増殖抑制作用

- 細胞特異性 -

VSMCs として、雄ラット大動脈由来細胞 (MSMC)、雌ラット大動脈由来細胞 (FSMC)、A10 の 3 種類の細胞およびヒト乳癌由来細胞 (MCF-7) を用いて、17 $\beta$ -estradiol による DNA 合成に対する影響をみた。confluent に達した細胞を、24 時間増殖停止後、5%DCC-FBS と 17 $\beta$ -estradiol および [<sup>3</sup>H]-thymidine を同時添加し、24 時間後に比較した。mean  $\pm$  SEM, n=6

\*, p < 0.05 vs control



つづいて、E2 の特異性について検討するため、A10 細胞を用いて他の性ステロイドで



ある progesterone、testosterone、ならびに 17 $\beta$ -estradiol の不活性型である 17 $\alpha$ -estradiol について DNA 合成に対する作用を比較した。17 $\beta$ -estradiol と異なり、progesterone、testosterone、17 $\alpha$ -estradiol には抑制作用はみられなかった (図 8)。

さらに、E2 の増殖抑制作用が、ある増殖因子に特異的なものであるかどうかを検討する目的で、0.2% BSA 存在下で PDGF-BB (10 ng/ml)、bFGF (10 ng/ml)、ET-1 (1  $\mu$ M) を増殖刺激として用いた。図 9 に示すように、E2 (1 nM) はいずれの増殖刺激に対しても約 50 % の抑制作用を示した。しかし、0.2% BSA のみの場合すなわち増殖刺激がほとんど無い場合には、E2 の効果はみられなかった。

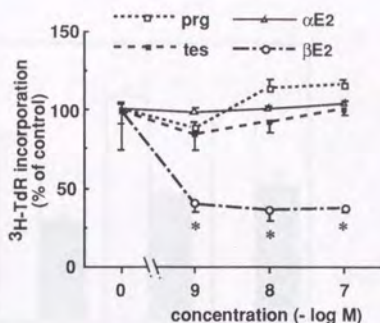


図 8. E2 の VSMCs 増殖抑制作用

- E2 の特異性 -

17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ E2)、17 $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2)、progesterone (prg)、testosterone (tes) の 4 種類のステロイドについて、A10 細胞を用いて、5%DCC-FBS の刺激による DNA 合成に対する作用を比較した。

mean  $\pm$  SEM, n=6, \*; p < 0.05 vs control

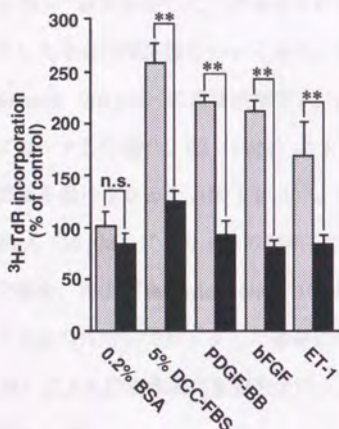


図 9. E2 の VSMCs 増殖抑制作用

- 増殖因子特異性 -

各種の増殖刺激に対する 17 $\beta$ -estradiol の効果を比較した。confluent に達した A10 細胞を 24 時間増殖停止後、0.2% BSA、5% DCC-FBS、PDGF-BB (10 ng/ml)、bFGF (10 ng/ml)、ET-1 (1  $\mu$ M) のいずれかと同時に、17 $\beta$ -estradiol (1 nM, E2(+)) または ethanol (E2(-)) を添加し、[ $^3$ H]-thymidine (TdR) の取り込みをみた。

\*\*; p < 0.01 vs E2(-), mean  $\pm$  SEM, n=6

□; E2 (-)    ■; E2 (+)

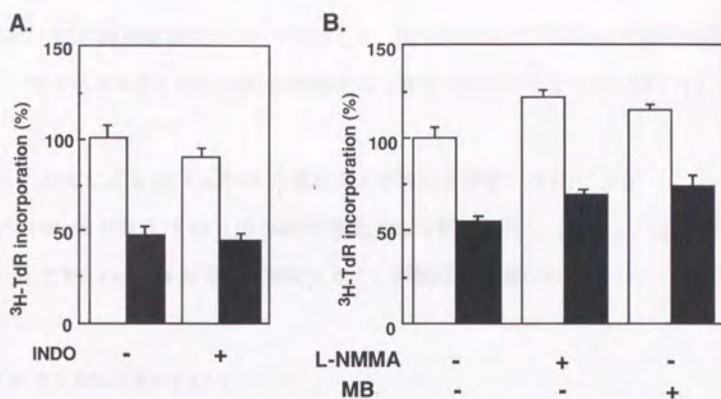


図 10. E2 による VSMCs 増殖抑制作用 - PGI<sub>2</sub> (A) および NO (B) の関与 -  
5% DCC-FBS と同時に、indomethacin 10  $\mu$ M (INDO)、L-NMMA 10  $\mu$ M (L-NMMA)、  
methylene blue 10  $\mu$ M (MB) または vehicle を添加し、E2 による VSMCs の DNA 合成  
抑制効果を比較した。A, B それぞれ 5% DCC-FBS のみの E2(-) 群に対する比率 (%) とし  
て示した (mean  $\pm$  SEM, 各 n=6)。□; E2(-) ■; E2(+) (1 nM)

また E2 が PGI<sub>2</sub>、NO の産生を促進するという報告<sup>20-22</sup> があり、増殖抑制作用が PGI<sub>2</sub> または NO の産生を介した二次的なものである可能性も考えられるため、この二つをブロックした場合の反応性についてみた。まず indomethacin (10  $\mu$ M) の同時添加で PGI<sub>2</sub> の産生をブロックした場合、E2 (1 nM) による抑制は影響を受けなかった (図 10.A)。また L-NMMA (10  $\mu$ M) により NO の産生をブロックした場合、および methylene blue (10  $\mu$ M) により NO の作用をブロックした場合にも E2 (1 nM) による抑制作用は影響を受けなかった (図 10.B)。

さらに、E2 による増殖抑制作用が細胞障害による非特異的なものである可能性を検討す

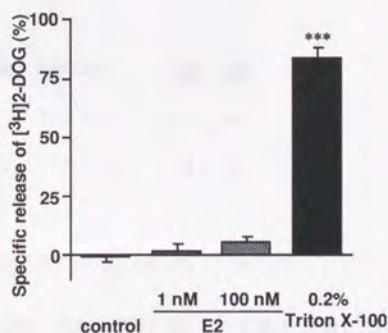


図 11. E2 による VSMCs 障害性の検討  
control (ethanol)、E2 (1 nM, 100 nM)、0.2% Triton X-100 で 2 時間処理した場合の、細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H]2-DOG の遊離率を測定した。mean  $\pm$  SEM, n=6

\*; p < 0.001 vs control



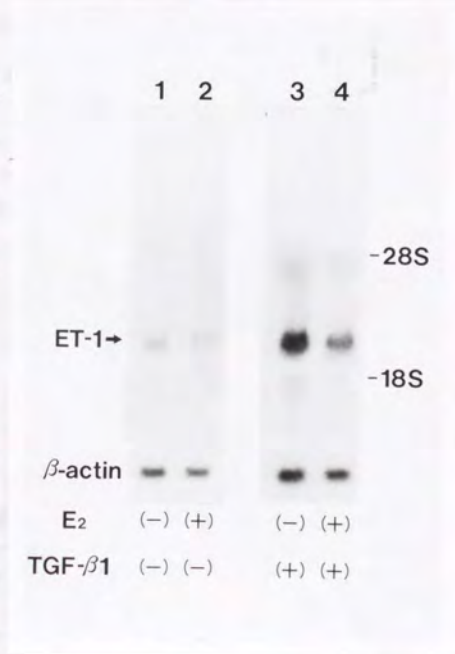
るため、E2 の細胞障害性について検討した。E2 1 nM および 100 nM では対照群と比較して、取り込まれた [3H]2-DOG の遊離率に有意な差を認めなかった (図 1 1)。

### 3.4. ECs による ET-1 mRNA の発現および培養上清中への ET-1 分泌

ET-1 mRNA の発現は E2 (10 nM) の前処置にて抑制された (図 1 2、lane 1, 2)。  
TGF- $\beta$ 1 で ET-1 mRNA の発現を刺激すると、抑制はより明らかであった (図 1 2、lane 3, 4)。

図 1 2. ウシ ECs における ET-1 mRNA の発現に対する E2 の効果

confluent に達した ECs を E2 10 nM (E2(+), lane 2, 4) もしくは ethanol (E2(-), lane 1, 3) を含む phenol-red (-) DMEM にて 24 時間培養。その後、TGF- $\beta$ 1 2.0 ng/ml (TGF- $\beta$ 1(+), lane 3, 4) もしくは vehicle (TGF- $\beta$ 1(-), lane 1, 2) を添加し、さらに 4 時間培養し RNA を抽出した。



タンパクレベルでの検討でも同様に、E2 (10 nM) の前処置は ET-1 の分泌を有意に抑制した (図 1 3)。TGF- $\beta$ 1 で刺激すると ET-1 の分泌は増加したが、E2 の有無による差には変化がみられなかった。

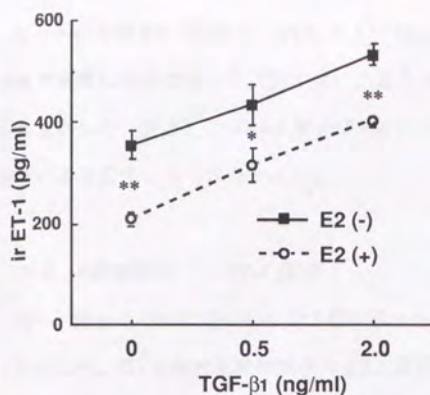


図 13. ECs による ET-1 分泌に対する E2 の抑制作用.

confluent に達した ECs を、17β-estradiol (10 nM, E2(+)) もしくは ethanol (E2(-)) を添加した phenol-red (-) DMEM で 24 時間培養した。その後 TGF-β1 (0, 0.5, 2.0 ng/ml) を添加しさらに 24 時間培養し、上清中の ET-1 濃度を ELISA で測定した。

mean ± SEM, 各 n=4

\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$

### 3.5. 血中 ET-1 濃度の性差および MCR

図 14. ラット血中 ET-1 濃度の性差.

Sham, OVX, OVX+E, Male の 4 群のラットから、覚醒下で大動脈に留置したカテーテルより採血し、血漿 ET-1 濃度を ELISA で測定した。

\*;  $p < 0.05$  vs Sham & OVX+E, mean ± SEM

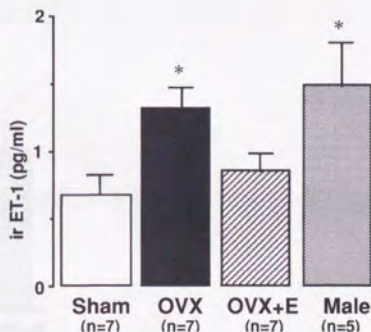


表 2. ET-1 infusion による血中 ET-1 濃度の変化と metabolic clearance rate (MCR)

infusion rate of ET-1 (ng/min/kg)	plasma ET-1 (pg/ml)			MCR (ml/min/kg)	
	0	0.2	0.6	0.2	0.6
Sham	0.70±0.20	1.73±0.42	3.43±0.71	233±42	288±74
OVX	1.44±0.18 <sup>a</sup>	2.93±1.02	4.09±0.62	337±90	261±45
OVX+E	0.84±0.13	2.48±0.50	4.69±0.51	169±47	167±24
Male	1.43±0.16 <sup>b</sup>	2.98±0.16	5.12±0.78	130±12	178±37

表中の数値は mean ± SEM. a;  $p < 0.05$  vs Sham, b;  $p < 0.05$  vs Sham & OVX+E. MCR には群間で有意差は認められない。



ラットの血漿 ET-1 濃度は、OVX および Male で Sham および OVX+E に比べて1.5-2 倍程度で有意に高値であった（図14）。また ET-1 の MCR には、4 群間で有意な差はみられなかった（表2）。MABP および HR には、群間に有意な差はなく、また ET-1 の投与による変化もみられなかった。

### 3.6. 大動脈組織での ET-1 発現

次に、Sham、OVX、OVX+E の3群のラットから得られた大動脈組織中の ET-1 を測定したところ、OVX の大動脈組織中の ET-1 量は、Sham および OVX+E に比べて有意に高値であった（図15）。

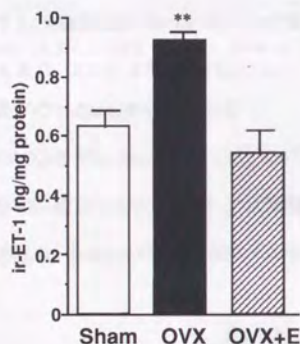


図15. 大動脈組織中の ET-1 量

Sham (n=7)、OVX (n=7)、OVX+E (n=6) の3群のラット大動脈を内膜剥離後ホモジナイズし、Sep-Pak C18 にて抽出。上清中の ET-1 濃度 (ir-ET-1) を測定、タンパク量で補正した。

\*\* :  $p < 0.01$  vs. Sham & OVX+E

mean  $\pm$  SEM

免疫染色で ET-1 の発現を検討したところ、Sham および OVX+E の大動脈ではほとんど染色されなかったのに対し（図16、A、C）、OVX では中膜平滑筋に強く染色される細胞が多く観察された（図16、B）。尚、正常マウス IgG を一次抗体に用いると、染色は全くみられなかった。

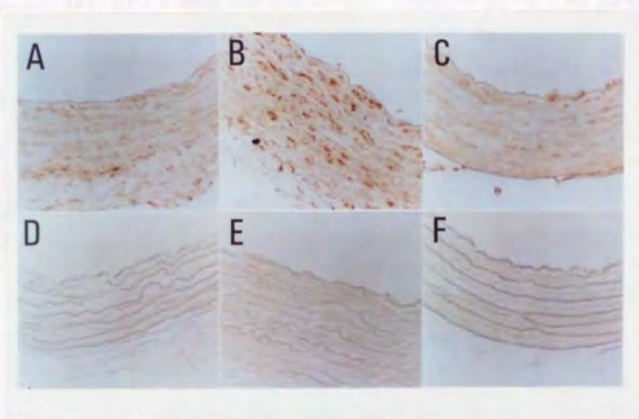


図16. 大動脈組織における ET-1 の発現 - 免疫組織化学的検討 -  
Sham (A, D)、OVX (B, E)、OVX+E (C, F) の胸部大動脈組織を、抗 ET-1 抗体 (A, B, C) または 正常 mouse IgG (D, E, F) を一次抗体として免疫染色を行った。

### 3.7. 組織での *c-fos* mRNA の発現

子宮では OVX+E で *c-fos* mRNA の発現が亢進していたのに対し (*c-fos*/β-actin density: OVX; 80%, OVX+E; 200% of Sham)、大動脈では OVX で *c-fos* mRNA の発現が亢進していた (*c-fos*/β-actin density: OVX; 210%, OVX+E; 70% of Sham、図17)。

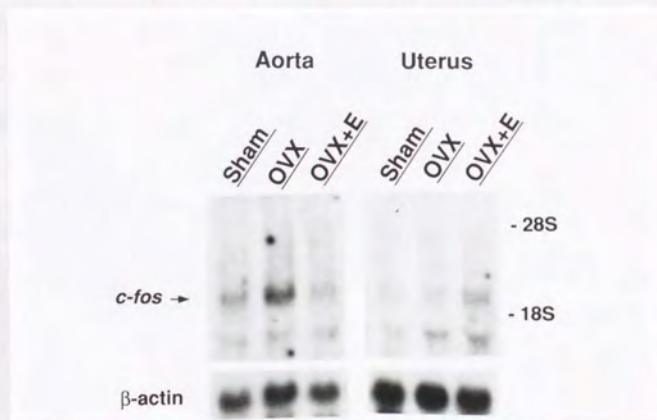
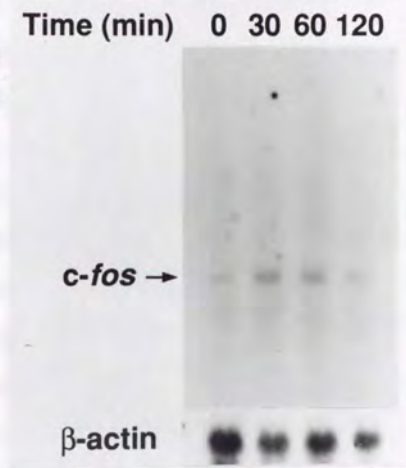


図17. ラット大動脈および子宮における *c-fos* mRNA の発現  
- 卵巣摘除およびエストロゲンの影響 -  
Sham、OVX、OVX+E の3群のラットから大動脈 (Aorta) および子宮 (Uterus) を摘出し、*c-fos* mRNA の発現をノーザンブロットで検討した。



また Sham に対し ET-1 の静脈内投与を行うと、大動脈における *c-fos* mRNA の発現亢進が 30 分をピークとして一過性にみられた (図 18)。尚、このときの血中 ET-1 濃度は、15 分以降ほぼ OVX の血中レベルに一致した (表 2 参照)。

図 18. ET-1 の静脈内投与による大動脈における *c-fos* mRNA の発現誘導  
Sham に ET-1 を 0.2 ng/kg/min の速度で静脈内持続投与し、0-120 分後にラットを屠殺し胸部大動脈を摘出、*c-fos* mRNA の発現を検討した。



### 3.8. 動脈組織での DNA 合成

組織培養による検討では、大動脈における DNA 合成は OVX で Sham に比べて有意に上昇していた。また、大腿動脈における DNA 合成は OVX で Sham および OVX+E に比べて有意に上昇していた (図 19)。

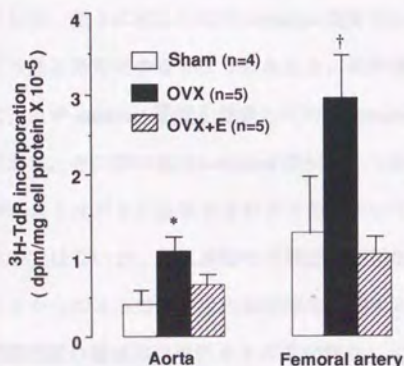


図 19. 血管壁における DNA 合成

- 卵巣摘除の影響 -

Sham、OVX、OVX+E の 3 群のラットから大動脈および大腿動脈を摘出。2-3 mm の切片を作成し、同一条件下で組織培養を行って [ $^3\text{H}$ ]-thymidine の取り込みを検討した。取り込みは組織タンパク量で補正し、2-4 切片の平均を各個体の数値とした。mean  $\pm$  SEM

\*;  $p < 0.05$  vs Sham

†;  $p < 0.05$  vs Sham & OVX+E

#### 4. 考察

本研究は、エストロゲンが抗動脈硬化作用を有することを *in vivo* で確認すると共に、その作用機序について検討することを目的とした。そこでまず最初に、カフ被覆によるラット大腿動脈内膜肥厚モデルを用いて、エストロゲンの抑制効果をみた。

これまでに、ポリエチレンカフ被覆による内膜肥厚モデルとしては、ウサギの大腿動脈<sup>42</sup>、頸動脈<sup>43</sup>について報告がある。またラットの大腿動脈を lipopolysaccharide に浸した綿糸で被覆することによる内膜肥厚の報告がみられる<sup>44</sup>。これらのモデルでは、光顕および電顕による観察から、一種の炎症反応による白血球の浸潤に引き続く内皮の障害および剥離、そして中膜平滑筋細胞の遊走および増殖という過程で内膜肥厚が形成されるとされている。この過程は、動脈硬化の発症過程として現在広く支持されている

Ross による "response to injury hypothesis"<sup>23</sup> に類似していることから、カフ被覆による内膜肥厚モデルは動脈硬化のモデルとして適切であると考えられる。本研究で用いたラット大腿動脈に対するカフ被覆についての報告はみられないことから、まず雄ラットを用いて内膜肥厚の経時的变化について検討した。その結果、内膜肥厚は2週目にピークを認めたため、雌雄差およびエストロゲンの効果については2週間でみた。

雌対照群の内膜肥厚は雄の約 1/2 であったが、卵巣摘除を行うことにより増加し、ほぼ雄と同レベルになった。また卵巣摘除にエストロゲンを補充することでこの増加は消失した。表1に示した血中 estradiol 濃度から考えると、本研究で用いたエストロゲンの投与量は非常に少ないようにみえる。血中濃度が維持されるデポ剤を投与したとはいえ、血中 estradiol 濃度を測定したのが estradiol の投与から1週間経過した時点であることから、その間の血中 estradiol 濃度はより高値であったと思われる。内膜肥厚の雌雄差がエストロゲンに由来するかどうかについては、雄にエストロゲン補充を行わないと明らかではないが、卵巣摘除で内膜肥厚が増加しエストロゲン補充でその増加が消失することからエストロゲンは内膜肥厚を抑制する作用を有すると考えられる。

内膜肥厚の雌雄差に男性ホルモンが関与している可能性については否定できない。老



年男性における血中テストステロン濃度が血中コレステロールおよびインスリン濃度と  
いった動脈硬化のリスクファクターと相関するという報告<sup>45</sup>、中年男性の血中男性ホル  
モン濃度が冠動脈疾患のリスクであるとする prospective study<sup>46</sup> がみられる。また男性  
ホルモンの投与<sup>47</sup> および内因性の男性ホルモン<sup>48</sup> が実験的動脈硬化を促進するという報  
告もみられ、男性ホルモンが動脈硬化に対して促進的に作用しうることを示唆する。一  
方、男性における男性ホルモンの低値が心筋梗塞のリスクとなる<sup>49, 50</sup>、コレステロール  
負荷したウサギの動脈硬化がテストステロンの投与により影響を受けない<sup>51</sup> といった報  
告もあり、男性ホルモンの動脈硬化に対する影響については現在でも議論がある。今後  
内膜肥厚に対する男性ホルモンの影響を明らかにするためには、雄ラットの去勢あるいは  
男性ホルモンの投与といった実験を行う必要があると考えられる。

従来エストロゲンの抗動脈硬化作用については、脂質代謝<sup>5, 6, 8-10</sup> および血圧<sup>38, 52, 53</sup>  
など動脈硬化のリスクファクターの改善を介した間接的な作用が示唆されているが、こ  
の実験では血圧、血清脂質に4群間で差はみられない。このことから、エストロゲンが  
直接血管壁に作用した結果、内膜肥厚を抑制した可能性があると考えられる。そこで次  
に、エストロゲンの作用機序のうち、特に血管壁細胞に対する作用について検討を行っ  
た。

VSMCsの遊走および増殖は上述したように内膜肥厚の本質であり、動脈硬化の発症  
において重要なステップであると考えられる。そこでまずラット培養 VSMCs を用いて、  
E2の遊走、増殖に対する影響を検討した。遊走の刺激として10% FBSを用いたが、予  
備実験の結果から5% FBSでは遊走する細胞が少なくE2の影響が明らかとなりにくい  
と考えたからである。また増殖の刺激としては5% FBSを用いたが、その理由は予備実  
験では10% FBSでは増殖刺激が強すぎるためかE2の効果が不十分であったからである。  
E2はVSMCsの遊走、増殖共に抑制した。また、増殖については、progesterone、  
testosterone についてもみたが、これらの性ステロイドには増殖に対する影響は認められ  
なかった。E2によるVSMCsの遊走抑制作用についてはこれまで報告がない。E2によ  
るVSMCsの増殖抑制作用についてはウサギ大動脈由来細胞<sup>54</sup>、ブタ冠動脈組織<sup>55</sup>を用

いた報告がみられ本研究の結果と一致するが、E2 がラット肺動脈由来細胞<sup>56</sup>の増殖を促進したとする報告もあり、一定の結論は得られていない。また従来の報告ではE2の濃度がかなり高いことと、細胞毒性の可能性が否定できないことが問題であった。本研究では、従来の報告より低濃度でしかも内膜肥厚の実験でみた血漿 E2 濃度と同レベルの濃度で抑制作用を示し、また細胞障害実験でも毒性による非特異的な結果ではないことが示唆された。このことから、エストロゲン補充療法による動脈硬化抑制作用に、VSMCs の遊走および増殖の抑制が関与している可能性があると考えられる。

さらに、E2 による VSMCs の増殖抑制作用の機序について検討する目的で実験を行った。まず、E2 による増殖抑制作用が特定の増殖因子に特異的なものである可能性を考え、血清刺激の他に PDGF-BB、bFGF、ET-1 についても検討したが、E2 はいずれの刺激に対しても抑制を示した。また、エストロゲンが VSMCs の増殖抑制因子である PGI<sub>2</sub>、NO の産生を刺激するという報告もみられるため<sup>20-22</sup>、これらをブロックした場合に E2 の増殖抑制作用が影響を受けるかどうかをみたところ、影響はみられなかった。本研究で検討していない何らかの増殖抑制因子を介している可能性は否定できないものの、増殖刺激が弱い場合 (0.2% BSA、0.1% DCC-FBS の刺激) には E2 による抑制はみられなかったことから、E2 は各種増殖刺激に共通した情報伝達経路を抑えることで作用を発揮する可能性が考えられる。一方、E2 の細胞内情報伝達経路については、現在のところ一種類しか知られていない。すなわちエストロゲンは主に細胞質でエストロゲン受容体と結合し、核内に移行したエストロゲン受容体がエストロゲン応答遺伝子の特定の塩基配列 (estrogen responsive element; ERE) に結合することでその遺伝子の転写を調節すると考えられている<sup>57-59</sup>。しかしながら、エストロゲンによる直接の血管拡張作用<sup>15, 16</sup>は数分で認められる現象であり、遺伝子の転写を介しているとは考えられない。したがって血管においては、膜レセプターの存在を含め細胞膜レベルでの情報伝達経路が想定されるが明らかではない。

エストロゲンによる血管壁細胞に対する作用としてさらに、血管作働物質・増殖因子の産生調節に興味をもたれる。これまでに、エストロゲンが ECs および VSMCs におけ



る PGI<sub>2</sub> の産生を刺激することが報告されている<sup>20, 21</sup>。また、卵巣摘除を行ったヤギに E<sub>2</sub> を投与した場合の子宮の血流増加が、NO 合成酵素の阻害剤である L-nitroarginine methyl ester により抑制される<sup>22</sup> ことから、エストロゲンに NO の産生を刺激する作用があることが示唆される。本研究では ET-1 の産生に対するエストロゲンの影響を検討した。ET-1 は強力な血管収縮ペプチドであるばかりでなく<sup>24</sup>、VSMCs の増殖作用を有すること<sup>25-27</sup> が知られている。また動脈硬化性疾患<sup>60</sup> を含む循環器疾患で血中 ET 濃度の上昇が報告されている<sup>61, 62</sup>。さらに動脈硬化病変で ET-1 の発現が亢進していたこと<sup>60, 63</sup>、ET 拮抗剤の投与でバルーン擦過による内膜肥厚が抑制されること<sup>64</sup> から、ET-1 が動脈硬化の発症・進展に関与していることが考えられる。しかしこれまでに、エストロゲンが ECs および VSMCs での ET-1 の産生を調節していることを示した報告は無い。

まず、ウシ頸動脈由来 ECs における ET-1 mRNA の発現と培養上清中への ET-1 タンパクの分泌をみたところ、いずれも E<sub>2</sub> 10 nM の前処置により抑制された。エストロゲンが ECs において遺伝子レベルで ET-1 の産生を調節していることを示したのは本研究が初めてである。

これまでに、血中 ET-1 濃度は男性で女性より高値を示すこと<sup>65, 66</sup>、また性ホルモンの投与により影響を受けること<sup>66</sup> が報告されている。本研究でも卵巣摘除ラットを用いて血中 ET-1 濃度における性差および E<sub>2</sub> の影響をみたところ、雄ラットと卵巣摘除ラットで、雌対照ラットに比べて血中 ET-1 濃度の上昇を認めた。卵巣摘除に E<sub>2</sub> を補充することで血中 ET-1 濃度の上昇は消失したことから、少なくとも雌ラットにおいては E<sub>2</sub> が血中 ET-1 濃度を低下させる作用を有すると考えられる。雄ラットで血中 ET-1 濃度が高いことについては、血漿 E<sub>2</sub> 濃度が低いことによると推測されるが、女性に testosterone を投与することにより血中 ET-1 濃度が多少上昇するという報告もあり<sup>66</sup>、testosterone の影響も否定できない。血中 ET-1 濃度の変化のみでは、それが産生に由来するものかあるいは分解に由来するものかは明らかではない。そこで本研究では、ET-1 の Metabolic clearance rate についても検討を行ったところ、雄および雌の 3 群のラットの間で有意な差は無く、血中 ET-1 濃度の差は ET-1 の産生の差によると考えられた。



ET-1はVSMCsでも産生されることが知られ<sup>67</sup>、またET-1を過剰発現させたVSMCsは増殖能が増すという報告もあり<sup>27</sup>、VSMCsで産生されたET-1がautocrine的にVSMCsに作用しうることが考えられる。本研究でラットVSMCsでのET-1の発現をみたところ、卵巣摘除で亢進し、E2補充により対照のレベルに戻った。この結果から、エストロゲンにはVSMCsでのET-1の産生も抑制する作用があると考えられる。

上述したようにエストロゲンはエストロゲン受容体を介して作用し、エストロゲン受容体はエストロゲン応答遺伝子のEREに結合し転写を調節するとされる<sup>57-59</sup>。しかし、ET-1遺伝子の5'上流領域にはEREは認められない<sup>68</sup>。よってエストロゲンがET-1遺伝子のその他の領域に作用してET-1の転写を調節している、もしくは他のエストロゲン応答遺伝子を介してET-1の発現を調節している可能性が考えられる。

本研究ではさらに、*c-fos* mRNAの発現に対するエストロゲンの効果を検討した。従来の報告<sup>69</sup>と同様に、子宮における*c-fos* mRNAの発現は、エストロゲン補充により亢進していた。一方、大動脈における*c-fos* mRNAの発現は、卵巣摘除で亢進し、エストロゲン補充で対照レベルに戻った。*c-fos* 遺伝子の5'上流領域にEREが存在し、エストロゲンが子宮癌細胞での*c-fos* 遺伝子の転写活性を高めるという報告があることから<sup>70</sup>、エストロゲンは直接子宮での*c-fos* mRNAの発現を亢進させる作用を有すると考えられる。それに対して、大動脈における*c-fos* mRNAの発現がエストロゲンにより抑制された理由については明らかではないが、他の因子が介在している可能性がある。大動脈における*c-fos* mRNAの発現調節に関与しうる物質として、ET-1が考えられる。ET-1は、培養VSMCsにおける*c-fos* mRNAの発現を刺激することが報告されている<sup>25</sup>。また本研究においても、ET-1の静脈内持続投与で、大動脈における*c-fos* mRNAの発現が、一過性ではあるが誘導された。静脈内投与に用いたET-1の濃度は低く、血中濃度が卵巣摘除ラットのレベルに上昇する程度であり、血圧にも影響を与えなかった。したがって卵巣摘除ラットにおいて血中ET-1濃度が上昇することが大動脈での*c-fos* mRNAの発現を増加させうると考えられる。ただし、ET-1の静脈内持続投与による*c-fos* mRNAの発現は一過性であり、卵巣摘除後3週で認められた*c-fos* mRNAの発現を説明するには不十

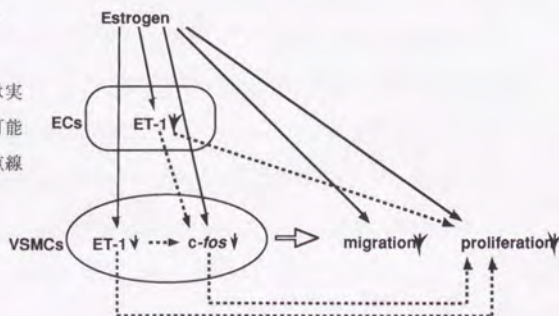
分である。本研究では卵巣摘除ラットにおいて血中 ET-1 濃度ばかりでなく VSMCs における ET-1 の発現も増加していることを示した。この結果から、血中 ET-1 濃度に加えて VSMCs における ET-1 の発現が *c-fos* mRNA の発現に関与している可能性が示唆される。

ラットの胸部大動脈および大腿動脈を用いた組織培養実験により、DNA 合成は卵巣摘除で増加し、エストロゲン補充でその増加は消失することを示した。カフ被覆による内膜肥厚モデルおよび培養 VSMCs を用いた実験でも示したように、エストロゲンの投与により VSMCs の増殖は抑制される。しかしながら、組織培養実験では培養液へのエストロゲンの添加は行っていないことから、卵巣摘除ラットの動脈組織における DNA 合成の増加はエストロゲンの増殖に対する直接作用によるものではないと考えられる。上述したように卵巣摘除ラットの VSMCs では ET-1 および *c-fos* mRNA の発現が亢進しており、ET-1 の発現ならびに *c-fos* 遺伝子の発現は細胞増殖と関連している<sup>27-29</sup> ことが報告されていることから、ET-1 および *c-fos* mRNA の発現が DNA 合成に影響した可能性があると思われる。本研究では ET-1 および *c-fos* mRNA の発現と DNA 合成との因果関係は明らかではなく、この点を解明するには今後 ET 受容体拮抗薬ならびに *c-fos* のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた検討が必要である。いずれにせよ卵巣摘除ラットの VSMCs では ET-1、*c-fos* mRNA の発現および増殖能が亢進しており、エストロゲン補充によりその増加は消失した。VSMCs は様々な条件により収縮型もしくは合成型の形質を示すことが知られているが<sup>71</sup>、卵巣摘除ラットの VSMCs は合成型に近い形質を

図 20. エストロゲンの作用機序  
における ET-1 の役割

作用について直接検討したものは実線  
で、直接検討はしていないが可能性が  
考えられる作用については点線で示した。

ECs: 血管内皮細胞、  
VSMCs: 血管平滑筋細胞、  
ET-1: endothelin-1





示し、エストロゲン補充により収縮型の形質に戻ったと考えられる。このことからエストロゲンは VSMCs の形質変換に影響を与える可能性が示唆され、今後検討すべき問題であると思われる。

以上、エストロゲンは (a) 血清脂質、血圧に影響することなくラット動脈内膜肥厚を抑制した。その作用機序として、エストロゲンによる (b) VSMCs の遊走および増殖抑制作用 (増殖抑制は増殖刺激に非特異的であり、PGI<sub>2</sub> および NO の関与は否定的であった。)、(c) ECs および VSMCs における ET-1 の産生抑制作用 (図 20)、(d) c-fos の血管壁における発現抑制作用が関与していることが示唆された。



## 5. 文献

1. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1976;85:447-452.
2. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1987;316:1105-1110.
3. Bush TL, Barrett-Conner E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation.* 1987;75:1102-1109.
4. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med.* 1991;325:756-762.
5. Kushwaha RS, Hazzard WR. Exogenous estrogens attenuate dietary hypercholesterolemia and atherosclerosis in the rabbit. *Metabolism.* 1981;30:359-366.
6. Adams MR, Clarkson TB, Kaplan JR, Koritnik DR. Experimental evidence in monkeys for beneficial effects of estrogen on coronary artery atherosclerosis. *Transplant Proc.* 1989;21:3662-3664.
7. Cheng LP, Kuwahara M, Jacobsson J, Foegh ML. Inhibition of myointimal hyperplasia and macrophage infiltration by estradiol in aorta allografts. *Transplantation.* 1991;52:967-972.
8. Rijpkema AHM, van der Sanden AA, Ruijs AHC. Effects of post-menopausal

- oestrogen-progestogen replacement therapy on serum lipids and lipoproteins: a review. *Maturitas*. 1990;12:259-285.
9. Lobo RA. Clinical review 27: effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73:925-930.
10. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 1991;325:1196-1204.
11. Colburn P, Buonassisi V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. *Science*. 1978;201:817-819.
12. Nakao J, Chang W-C, Murota S-I, Orimo H. Estradiol-binding sites in rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*. 1981;38:75-80.
13. Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, Muramatsu M, Orimo H. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195:730-736.
14. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*. 1994;89:1943-1950.
15. Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 $\beta$ -oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 1991;104:1033-1037.
16. Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 $\beta$ -estradiol on rabbit coronary artery contractile response to endothelin-1. *Am J Physiol*. 1992;263:H271-275.
17. Williams JK, Adams MR, Klopfenstein HS. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 1990;81:1680-1687.
18. Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker



- JA. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;89:52-60.
19. Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;90:786-791.
20. Seillan C, Ody C, Russo-Marie F, Duval D. Differential effects of sex steroids on prostaglandin synthesis by male and female cultured piglet endothelial cells. *Prostaglandins*. 1983;26:3-12.
21. Chang W-C, Nakao J, Orimo H, Murota S-I. Stimulation of prostacyclin biosynthetic activity by estradiol in rat aortic smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Acta*. 1980;619:107-118.
22. Van Buren G, Yang D, Clark KE. Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;16:828-833.
23. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
24. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415.
25. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1988;238:249-252.
26. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1989;78:225-228.
27. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*. 1994;269:10112-10118.



28. Kaczmarek L, Kaminska B. Molecular biology of cell activation. *Exp. Cell Res.* 1989;183:24-35.
29. Curran T, Bravo R, Muller R. Transient induction of c-fos and c-myc in an immediate consequence of growth factor stimulation. *Cancer Surv.* 1985;4:655-681.
30. Ishikawa M, Ouchi Y, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H. Immunocytochemical detection of parathyroid hormone-related protein in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199:547-551.
31. Kimes BW, Brandt BL. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res.* 1976;98:349-366.
32. Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976;36:4595-4601.
33. Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acids from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979;18:5294-5299.
34. Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, Masaki T, Fujino M. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Method.* 1989;118:245-250.
35. Grotendorst GR, Seppä HEJ, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:3669-3672.
36. Ouchi Y, Hirosumi J, Watanabe M, Hattori A, Nakamura T, Orimo H. Inhibitory effect of transforming growth factor- $\beta$  on epidermal growth factor-induced proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157:301-307.

37. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159:1435-1440.
38. Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks D. Sex differences in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*. 1987;9:172-177.
39. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164:74-80.
40. Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Matsuse T, Hashimoto M, Yamada R, Ouchi Y, Orimo H, Muramatsu M. Expression of follistatin, an activin-binding protein, in vascular smooth muscle cells and arteriosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1859-1864.
41. Hamaoki M, Kato H, Sugi M, Fujimoto M, Kurihara H, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Kimura S, Masaki T, Yazaki Y. Monoclonal antibodies to endothelin: application for sandwich immunoassays. *Hybridoma*. 1990;9:63-69.
42. Gebrane J, Roland J, Orcel L. Experimental diffuse intimal thickening of the femoral arteries in the rabbit. *Virchows Arch Pathol Anat*. 1982;396:41-59.
43. Hirosumi J, Nomoto A, Ohkubo Y, Sekiguchi C, Mutoh S, Yamaguchi I, Aoki H. Inflammatory responses in cuff-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1987;64:243-254.
44. Prescott MF, McBride CK, Court M. Development of intimal lesions after leukocyte migration into the vascular wall. *Am J Pathol*. 1989;135:835-846.
45. Deutscher S, Bates MW, Caines MJ, LaPorte RE, Puntereri A, Arena VC. Relationships between serum testosterone, fasting insulin and lipoprotein levels



- among elderly men. *Atherosclerosis*. 1989;75:13-22.
46. Hautanen A, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Huttunen JK, Frick MH, Adlercreutz H. Adrenal androgens and testosterone as coronary risk factors in Helsinki Heart Study. *Atherosclerosis*. 1994;105:191-200.
47. Fischer GM, Bashey RI, Rosenbaum H, Lyttle CR. A possible mechanism in arterial wall for mediation of sex difference in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 1985;43:288-296.
48. Clarkson TB, Adams MR, Kaplan JR, Koritnik DR. Gonadal steroids in cardiac atherosclerosis in primates. *Transplant Proc*. 1987;19:85-89.
49. Sewdarsen M, Vythilingum S, Jialal I, Desai RK, Becker P. Abnormalities in sex hormones are a risk factor for premature manifestation of coronary artery disease in South African Indian men. *Atherosclerosis*. 1990;83:111-117.
50. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:701-706.
51. Larsen BA, Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. Effect of testosterone on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits with similar plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis*. 1993;99:79-86.
52. Hoeg JM, Willis LR, Weinberger MH. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1977;233:H369-373.
53. Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med*. 1979;94:608-616.
54. Fischer-Dzoga K, Wissler RW, Vesselinovitch D. The effect of estradiol on the proliferation of rabbit aortic medial tissue culture cells induced by hyperlipemic serum. *Exp Mol Pathol*. 1983;39:355-363.
55. Vargas R, Wroblewska B, Rego A, Hatch J, Ramwell PW. Oestradiol inhibits



- smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br J Pharmacol.* 1993;109:612-617.
56. Farhat MY, Vargas R, Dingaam B, Ramwell PW. In vitro effect of oestradiol on thymidine uptake in pulmonary vascular smooth muscle cell: role of the endothelium. *Br J Pharmacol.* 1992;107:679-683.
57. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 1988;4:309-314.
58. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;240:889-895.
59. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 1989;56:335-344.
60. Lerman A, Brooks SE, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1991;325:997-1001.
61. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N, Fujino M, Ajisaka R, Goto K, Masaki T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1989;2:53-54.
62. Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;322:205.
63. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, Libby P. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:1081-1088.
64. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Storer BL, Hart T, Feuerstein GZ, Elliot JD, Ohlstein EH. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty: Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res.* 1994;75:190-197.
65. Miyauchi T, Yanagisawa M, Iida K, Ajisaka R, Suzuki N, Fujino M, Goto K, Masaki

- T, Sugishita Y. Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am Heart J*. 1992;123:1092-1093.
66. Polderman KH, Stehouwer CDA, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FWA, Gooren LJG. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med*. 1993;118:429-432.
67. Resink TJ, Hahn AWA, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Bühler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:1303-1310.
68. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene: complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*. 1989;264:14954-14959.
69. Weisz A, Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol*. 1988;2:816-824.
70. Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:5097-5106.
71. Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ. A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*. 1987;63:99-107.



