

総説

細胞内アルカリ化と血管機能

若林 一郎*, 諏佐 真治*, 後藤 薫**

はじめに

血液の pH は血管緊張に影響を及ぼす。アシドーシスにより血管は弛緩し、アルカローシスにより収縮する^{1,2)}。その主なメカニズムとして、血管平滑筋細胞の電位依存性カルシウムチャネル機能の pH 依存性が報告されている³⁾。一方、細胞内 pH は細胞外 pH の変化に影響されるが、血管平滑筋細胞では他の平滑筋細胞や心筋細胞に比べて細胞外 pH 変化時の細胞内 pH 変化がより急速に起こる⁴⁾。さらに様々なアゴニストにより細胞が刺激された際に、形質膜の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交換系 ($\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger, NHE) の活性が亢進し、ナトリウムイオン流入とプロトン排出が同時に起こる結果、細胞内 pH が上昇する。本総説では血管平滑筋および内皮における細胞内アルカリ化と血管機能との関連性について概説する。

血管平滑筋の収縮機能と細胞内 pH

NHE はアシドーシス時に作動する主な細胞内 pH 調節メカニズムとして重要であるが、NHE のアイソフォームの中でも形質膜で恒常的に発現している NHE-1 活性は、受容体刺激時のフォスファチジルイノシトール水解反応とリンクして起こるプロテインキナーゼ C 活性化により上昇することが知られている⁵⁾。また、最近では MAPK (mitogen-activated protein kinases) や RTK (receptor tyrosine kinases) が NHE-1 の活性化に重要であるとの報告がある^{6,7)}。さらに、NHE-1 はカルモジュリン結合部位を有し、細胞内カルシウムイオンの上昇によっても活性化される⁸⁾。血管平滑筋ではアンギ

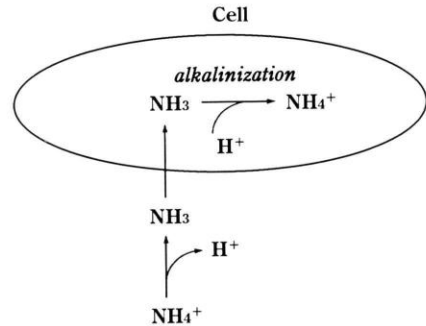


図1 アンモニウムイオンによる細胞内アルカリ化の機序

オテンシン II, バゾプレシン, エンドセリン, トロンビンなどのアゴニストにより NHE-1 が活性化され細胞内アルカリ化が惹起されることが報告されている^{9~12)}。実験で細胞内アルカリ化を惹起する方法として、塩化アンモニウムなどの弱アルカリイオンの投与がよく用いられる。その際、アンモニアの形で細胞内に流入した分子が細胞内でプロトンを享受して再度イオン化された結果、細胞内がアルカリ化される(図1)。塩化アンモニウムによる細胞内アルカリ化はラット大動脈、ブタ冠動脈、イヌ肺動脈、ラット門脈などで持続性の収縮を惹起する^{13~16)}。一方、腸間膜や脳の細動脈では細胞内アルカリ化による血管収縮は認められず、逆に細胞内酸性化によって一過性の収縮が誘発される^{17~19)}。このように細胞内アルカリ化が血管緊張に及ぼす作用は小(抵抗)血管の場合と大血管の場合とで異なると考えられる。大血管でみられる細胞内アルカリ化による血管緊張増加のメカニズムとして、電位依存性カルシウムチャネルや容量依存性(ストア作動性)カルシウムチャネルを介するカルシウムイオンの細胞外から内への流入の増加や^{20~22)}、一過性の細胞内カルシウム貯蔵プール

*山形大学医学部環境病態統御学講座環境病態医学分野

**同 医学部情報構造統御学講座組織細胞生物学分野

Vascular smooth muscle cell

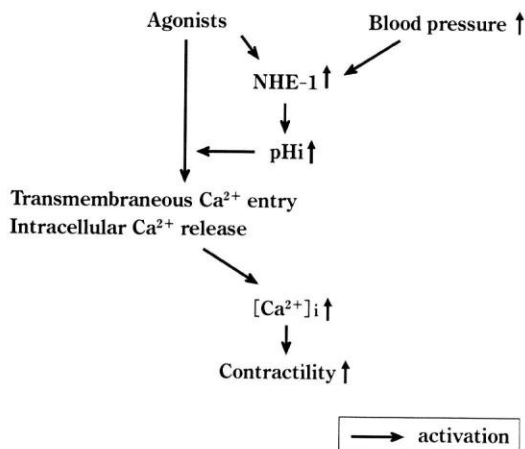


図2 血管平滑筋収縮と細胞内アルカリ化との関係

からのカルシウム放出などが報告されている²³⁾(図2)。しかし、形質膜や小胞体膜に存在する様々なチャンネルのpH依存性など、収縮機能と関連した細胞内アルカリ化の作用メカニズムの詳細は不明である。

一方、本態性高血圧患者由来の血小板ではNHE活性が亢進していることが知られている²⁴⁾。同様の現象が血管平滑筋細胞でも予想されるが、高血圧患者におけるNHE活性の亢進は、その成因というよりも、むしろ高血圧の結果出現するG蛋白活性化の亢進を介して二次的に起こると考えられている²⁵⁾。

細胞内アルカリ化と血管平滑筋細胞の増殖

細胞内アルカリ化と細胞増殖についてはこれまでに多くの報告があるが、最近では癌化に伴って細胞内アルカリ化やNHE発現の増加が惹起されることや、逆に細胞内酸性化およびNHE阻害剤により癌細胞の増殖が抑制されることが報告されている²⁶⁾。またβ-アドレナリン作動性受容体のトランスジェニックマウスで惹起される心肥大がNHE阻害剤であるHOE642によって予防されることが示されている²⁷⁾。これらの結果から細胞増殖において細胞内アルカリ化がゲートキーパー的な役割を果たしていることが示唆されており、血管平滑筋においても同様の制御機構の存在が推測される。

血管平滑筋の収縮や弛緩による血流調節が収縮型と呼ばれる分化した形態の血管平滑筋細胞によ

って行われているのに対して、動脈硬化巣や冠動脈再狭窄病変などのリモデリングにおいては、蛋白合成能や増殖能に富んだ細胞へと形質転換した合成型と呼ばれる血管平滑筋細胞が主体となる。この形質転換は血小板、マクロファージ、血管内皮細胞などの平滑筋周辺細胞から分泌されるPDGF(platelet-derived growth factor), EGF(epidermal growth factor), FGF(fibroblast growth factor), TGF(transforming growth factor)-β, prostaglandin E₂, thromboxane A₂, NO(nitric oxide)などによって誘導される²⁸⁾。これらの成長因子やサイトカインによる平滑筋細胞の増殖制御機構として、レセプターを介したRTKやMAPK活性化のシグナル伝達経路が知られている。PDGFとEGFはウシ肺動脈平滑筋細胞の細胞内アルカリ化と増殖促進を惹起し、これらの作用はいずれもNHE阻害剤であるDMA(dimethyl amiloride)によって抑制される²⁹⁾。したがってこれらの成長因子がNHEの活性化による細胞内アルカリ化を介して平滑筋細胞の増殖を促進していることが示唆される。NHEにおいて中心的役割を担うNHE-1と血管平滑筋の増殖との関連性について、これまでにいくつかの報告がされている。家兎大動脈において増殖の盛んな胎生期や新生児期には成長後に比べNHE-1の発現が高い傾向があり、またバルーン傷害後の血管壁でも平滑筋細胞の増殖とともにNHE-1発現の増加が観察されている。また同時に血管平滑筋細胞の培養系ではNHE-1発現は対数増殖期に増加し静止期に減少することが示された³⁰⁾。さらにNHE-1の発現はPDGFやFGF刺激により誘導されることも報告されている³¹⁾。以上の知見から、成長因子などの受容体刺激によってNHE-1の発現が亢進するとともに、フォスファチジルイノシトール代謝亢進によるプロテインキナーゼC活性化の結果NHE-1活性も上昇し、細胞内アルカリ化が惹起され細胞増殖が促進されることが考えられる。細胞内アルカリ化による細胞増殖促進の機序については明らかでないが、ラット培養大動脈平滑筋細胞では、塩化アンモニウムによる細胞内アルカリ化は、細胞増殖の重要なシグナルと考えられているERK-MAPKの活性化には影響を及ぼさなかった。一方、プロピオン酸による細胞内酸性化によりERKは活性化された。またTrisの添加により惹起された細胞外ア

ルカリ化は ERK 活性を亢進させ、この作用は NADPH oxidase の活性化による酸化的ストレスの増加による可能性が示唆されている³²⁾。

一方、高血圧モデルの SHR (spontaneously hypertensive) ラットとその対照である WKY (Wistar Kyoto) ラットの胸部大動脈平滑筋細胞を比較すると、NHE-1 の発現量には差がないものの、NHE-1 活性と細胞増殖能が SHR ラット由来の平滑筋細胞で亢進していることが示された³³⁾。この結果から高血圧は NHE-1 の発現には影響を及ぼさないものの、転写後の修飾により NHE-1 活性が上昇し細胞増殖が亢進する可能性が推測される。このように NHE-1 活性化を介する細胞内アルカリ化は高血圧に伴う動脈のリモデリングに関与すると考えられる。また最近、肺動脈平滑筋細胞において NHE 阻害剤である DMA の投与がアポトーシスを惹き起こすことが報告された³⁴⁾。今後、血管平滑筋細胞内 pH の変化が細胞増殖などの動脈硬化進展の分子メカニズムにどのように関与しているか、さらなる研究が必要である。

血管内皮細胞での NO 産生と細胞内 pH

ブタ大動脈血管内皮細胞ではブラジキニンなどの刺激により一過性の細胞内酸性化に引き続いて、持続性の細胞内アルカリ化が惹起される。この細胞内アルカリ化は内皮細胞での NO 産生と関連するが、細胞内カルシウムイオンの上昇とは関連せず、アルカリ化による NO 合成酵素活性の上昇によると報告されている³⁵⁾。さらにラット脳底動脈のアセチルコリンやブラジキニン刺激時の NO による弛緩反応は NHE 阻害剤で抑制され、逆に細胞内アルカリ化を惹起するモノメチラミンによって増強することから、この反応に細胞内アルカリ化が関与していると考えられる³⁶⁾。一方、ヒト臍帯静脈内皮由来の cell line では塩化アンモニウムによる細胞内アルカリ化は容量依存性カルシウム流入を抑制する³⁷⁾。これと一致して、ラット大動脈でのアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応は塩化アンモニウムの前処置により抑制されることが報告されている³⁸⁾。さらにブタ冠動脈でのサブスタンス P による内皮依存性弛緩反応も塩化アンモニウムの前処置により抑制されるが、この際に細胞内カルシウムイオンの上昇は影響を受けな

Vascular endothelial cell

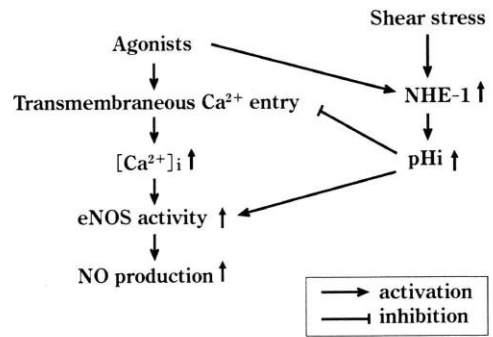


図3 血管内皮細胞の NO 産生における細胞内アルカリ化の意義

った³⁹⁾。また、非刺激時のヒト肺動脈内皮細胞では、塩化アンモニウムによる細胞内アルカリ化は細胞内カルシウムイオン濃度には影響を与えないという⁴⁰⁾。以上から、図3に示すように血管内皮細胞での NO 産生における細胞内アルカリ化の意義は、血管の種類や実験条件(機械的アルカリ化とアゴニズト刺激に伴うアルカリ化)により異なると考えられる。大血管(動脈)の平滑筋と内皮ではいずれもアゴニズト刺激に伴い持続性の細胞内アルカリ化が惹起されるが、血管平滑筋細胞で観察されるような細胞内アルカリ化によるカルシウム流入の増加は血管内皮細胞では認められず、両細胞間で細胞内アルカリ化の意義が異なると考えられる。

shear stress および低酸素と血管内皮細胞内 pH

血流による shear stress は血管内皮細胞からの NO 放出の重要な生理的刺激因子である⁴¹⁾。ラット大動脈培養内皮細胞では shear stress の影響によって細胞内酸性化が生じ⁴²⁾、逆に急速な shear stress の減衰で細胞内アルカリ化が惹き起こされ⁴³⁾、さらに内皮依存性血管収縮とも関係していると報告されている⁴⁴⁾。一方、ウシ大動脈培養内皮細胞を用いた研究では平均灌流圧を上昇させると持続性の細胞内酸性化が起こるのに対して、平均灌流圧および灌流速度を一定にして灌流圧をパルス状に変化させると逆に細胞内アルカリ化が観察され、この細胞内アルカリ化は NHE 阻害剤や ERK-MAPK 阻害剤の存在下では観察されなかったという⁴⁵⁾。このように shear stress の加わり方によっても血管内皮細胞内 pH の変化が異なることが示唆

される。また shear stress は細胞内カルシウムイオン濃度には影響せず、チロシンリン酸化を介して NO 生成を促進することが示されている⁴⁶⁾。しかし shear stress により誘発される細胞内 pH の変化と血管内皮細胞での NO など血管作動性物質の産生との関係は未だ明らかにされていない。一方、低酸素は血管内皮機能を変化させるが、低酸素により NHE の活性化⁴⁷⁾や細胞内 pH の上昇⁴⁸⁾を介して細胞内への Na⁺ 流入が誘導されることが報告されている。

おわりに

受容体刺激とリンクした NHE-1 活性化により惹起される細胞内アルカリ化は血管平滑筋の収縮や増殖に関与する細胞内シグナルの一つである可能性が示唆される。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでなく、さらに血管の種類によっても細胞内アルカリ化の影響は異なる。また、細胞内アルカリ化の血管内皮機能におよぼす影響は血管平滑筋の場合とは異なるが、ここでも細胞内アルカリ化の影響は血管の種類によって異なり、そのメカニズムに関しても不明な点が多く、今後の研究が待たれる。

文 献

- 1) Rooke TW, Sparks HV Jr: Effect of metabolic versus respiratory acid-base changes on isolated coronary artery and saphenous vein. *Experientia* 1981; 37: 982-3.
- 2) Dacey RG Jr, Duling BR: A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. *Am J Physiol* 1982; 243: H598-606.
- 3) Klöckner U, Isenberg G: Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *J Gen Physiol* 1994; 103: 665-78.
- 4) Austin C, Wray S: Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes. *J Physiol* 1993; 466: 1-8.
- 5) Grinstein S, Rothstein A: Mechanisms of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol* 1986; 90: 1-12.
- 6) Grinstein S, Rotin D, Mason MJ: Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 73-97.
- 7) Noel J, Pouyssegur J: Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am J Physiol* 1995; 268: C283-96.
- 8) Wakabayashi S, Ikeda T, Iwamoto T, et al: Calmodulin-

binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 through sequence-specific interaction. *Biochemistry* 1997; 36: 12854-61.

- 9) Berk BC, Aronow MS, Brock TA, et al: Angiotensin II-stimulated Na⁺-H⁺ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 1987; 262: 5057-64.
- 10) Berk BC, Taubman MB, Griendling KK, et al: Thrombin-stimulated events in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 1991; 274: 799-805.
- 11) Kikeri D, Zeidel ML, Ballermann BJ, et al: pH regulation and response to AVP in A10 cells differ markedly in the presence vs. absence of CO₂-HCO₃⁻. *Am J Physiol* 1990; 259: C471-83.
- 12) Koh E, Morimoto S, Kim S, et al: Endothelin stimulates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int* 1990; 20: 375-80.
- 13) Danthuluri NR, Deth RC: Effects of intracellular alkalization on resting and agonist-induced vascular tone. *Am J Physiol* 1989; 256: H867-75.
- 14) Wakabayashi I, Kukovetz WR, Groschner K: NH₄Cl-induced contraction of porcine coronary artery involves activation of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ entry. *Eur J Pharmacol* 1996; 299: 139-47.
- 15) Krampetz IK, Rhoades RA: Intracellular pH: effect on pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1991; 260: L516-21.
- 16) Wakabayashi I, Hatake K, Sakamoto K: Ammonium ion increases the tone of rat portal vein. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 1189-92.
- 17) Matthews JG, Graves JE, Poston L: Relationships between pHi and tension in isolated rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res* 1992; 29: 330-40.
- 18) Tian R, Vogel P, Lassen NA, et al: Role of extracellular and intracellular acidosis for hypercapnia-induced inhibition of tension of isolated rat cerebral arteries. *Circ Res* 1995; 76: 269-75.
- 19) Apkon M, Boron WF: Extracellular and intracellular alkalization and the constriction of rat cerebral arterioles. *J Physiol* 1995; 484: 743-53.
- 20) Schuhmann K, Voelker C, Hofer GF, et al: Essential role of the beta subunit in modulation of C-class L-type Ca²⁺ channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997; 408: 75-80.
- 21) Wakabayashi I, Masui H, Groschner K: Intracellular alkalization augments α_1 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction by promotion of Ca²⁺ entry through the non-L-type Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol* 2001; 428: 251-9.
- 22) Wakabayashi I, Marumo M, Sotoda Y: Intracellular alkalization augments capacitative Ca²⁺ entry in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:

- 903-7.
- 23) Siskind MS, McCoy CE, Chobanian A, et al: Regulation of intracellular calcium by cell pH in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1989; 256: C234-40.
 - 24) Siffert W, Dusing R: Sodium-proton exchange and primary hypertension. An update. *Hypertension* 1995; 26: 649-55.
 - 25) Siffert W, Roszkopf D, Moritz A, et al: Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1995; 96: 759-66.
 - 26) Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, et al: Na^+/H^+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14: 2185-97.
 - 27) Engelhardt S, Hein L, Keller U, et al: Inhibition of Na^+/H^+ exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in β_1 -adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res* 2002; 90: 814-9.
 - 28) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
 - 29) Quinn DA, Dahlberg CG, Bonventre JP, et al: The role of Na^+/H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 139-45.
 - 30) Takewaki S, Kuro-o M, Hiroi Y, et al: Activation of Na^+/H^+ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 729-42.
 - 31) Rao GN, Sardet C, Pouyssegur J, et al: Differential regulation of Na^+/H^+ antiporter gene expression in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic stimuli. *J Biol Chem* 1990; 265: 19393-6.
 - 32) Susa S, Wakabayashi I: Extracellular alkalosis activates ERK mitogen-activated protein kinase of vascular smooth muscle cells through NADPH-mediated formation of reactive oxygen species. *FEBS Lett* 2003; 554: 399-402.
 - 33) LaPointe MS, Ye M, Moe OW, et al: Na^+/H^+ antiporter (NHE-1 isoform) in cultured vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 1995; 47: 78-87.
 - 34) Yao W, Qian G, Yang X: Roles of NHE-1 in the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells in rats. *Chin Med J* 2002; 115: 107-9.
 - 35) Fleming I, Hecker M, Busse R: Intracellular alkalinization induced by bradykinin sustains activation of the constitutive nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circ Res* 1994; 74:1220-6.
 - 36) Kitazono T, Kamouchi M, Ago T, et al: Role of Na^+/H^+ exchanger in dilator responses of rat basilar artery in vivo. *Brain Res* 2001; 906: 101-6.
 - 37) Wakabayashi I, Groschner K: Divergent effects of extracellular and intracellular alkalosis on Ca^{2+} entry pathways in vascular endothelial cells. *Biochem J* 1997; 323: 567-73.
 - 38) Ando K, Fujita T: Inhibitory effect of ammonium chloride on acetylcholine-induced relaxation. *Hypertension* 1994; 24: 189-94.
 - 39) Shimizu S, Paul RJ: Hypoxia and alkalinization inhibit endothelium-derived nitric oxide but not endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 335-44.
 - 40) Nishio K, Suzuki Y, Takeshita K, et al: Effects of hypercapnia and hypocapnia on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization in human pulmonary artery endothelial cells. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2094-100.
 - 41) Davies PF, Tripathi SC: Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res* 1993; 72: 239-45.
 - 42) Ziegelstein RC, Cheng L, Capogrossi MC: Flow-dependent cytosolic acidification of vascular endothelial cells. *Science* 1992; 258: 656-9.
 - 43) Ziegelstein RC, Blank PS, Cheng L, et al: Cytosolic alkalinization of vascular endothelial cells produced by an abrupt reduction in fluid shear stress. *Circ Res* 1998; 82: 803-9.
 - 44) Langille BL, O'Donnell F: Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986; 231: 405-7.
 - 45) Wittstein IS, Qiu W, Ziegelstein RC, et al: Opposite effects of pressurized steady versus pulsatile perfusion on vascular endothelial cell cytosolic pH: role of tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase signaling. *Circ Res* 2000; 86: 1230-6.
 - 46) Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, et al: Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996; 78: 750-8.
 - 47) Mazzoni MC, Intaglietta M, Cragoe EJ, et al: Amiloride-sensitive Na^+ pathways in capillary endothelial cell swelling during hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1467-73.
 - 48) Foy RA, Shimizu S, Paul RJ: The effects of hypoxia on pH_i in porcine coronary artery endothelium and smooth muscle. A novel method for measurements in endothelial cells in situ. *Circ Res* 1997; 80: 21-7.