

特 集

アンギオテンシン II による抵抗血管のトーン調節機構

伊藤 猛雄*, 渡邊 義将*, 梶栗 潤子*, 山本 珠生*
 中野 庸一郎**, 白石 良久**, 上村 裕一**

はじめに

全身の循環血液量の減少は腎臓の輸入・輸出細動脈の血流量を減少させる。この減少は、輸入・輸出細動脈壁に存在する傍糸球体装置からのレニン分泌を促進させる。レニンは血液中に存在するアンギオテンシノーゲンの分解によりアンギオテンシン I (Ang I) を生成させ、さらに、Ang I は血管内皮細胞に存在するアンギオテンシン変換酵素 (ACE) によりアンギオテンシン II (Ang II) へと変化する。Ang II は type 1 受容体 (AT₁R) の活性化により直接および交感神経興奮を介した間接作用によって、血管を収縮させるとともに、心臓興奮作用により、血圧を上昇させる。これらの反応は、腎血流量を増加させるためのフィードバック機構として重要な生理的役割を担っている。しかしながら、Ang II の濃度が慢性的に増加した状態が持続すると、種々の循環器疾患の発症要因や増悪化因子となると考えられている。Ang II は、全身性に生成するとともに、組織局所でも生成する。この後者の機序は、局所レニン-アンギオテンシン系とよばれ、この系の活性化と循環器疾患発症との密接な関連性が報告されている。組織局所での慢性的な Ang II 増加は、活性酸素種の産生増加などの機序により臓器不全に関与している可能性が示唆されている。

血管内皮細胞は一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO), prostacyclin, 膜過分極因子 (EDHF) を生成・遊離し血管トーンを調節しており、これらの内皮由来

弛緩因子 (特に、NO) の機能障害は種々の循環器疾患の危険因子であると考えられている。抵抗血管の内皮細胞に慢性的に増加した Ang II は、活性酸素種の産生増加などにより循環不全を発生し、臓器不全へと導く可能性がある。事実、高血圧、心不全や糖尿病では血管壁に局在する Ang II 量が増加すると報告されている。しかしながら、抵抗血管壁に増加した Ang II による内皮機能障害の機序は不明な点が多い。

我々は、①正常なウサギ腸間膜細動脈の血管壁に Ang II が局在しており、この Ang II が抵抗血管での NO による平滑筋弛緩反応の感受性を減少させていること、一方、②慢性的に Ang II を増加させたウサギの腸間膜細動脈では、内皮細胞由来 NO の機能障害のみならず EDHF の機能障害も発生していること、を見出した。さらに、後者の条件下の血管では、血管平滑筋における NO による弛緩反応も減弱していた。このように、血管壁に増加した Ang II は濃度依存性および時間依存性の機序により内皮機能を調節している可能性がある。本論文では、細動脈に局在する Ang II による内皮機能調節機構について、最近の我々の研究結果を中心に報告する。

生理的条件下で血管に局在する Ang II による内皮機能調節

正常ウサギより得られた腸間膜細動脈血管壁には、ACE や Ang II および AT₁R が存在する。生理的条件下で細動脈血管壁に局在する Ang II の内皮機能調節機序を明らかにするため、内皮温存標本でのアセチルコリン (ACh) による弛緩反応に対する AT₁R 遮断薬 (ARB) オルメサルタンの効果について

*名古屋大学大学院医学研究科薬理学

**鹿児島大学大学院医歯学総合研究科、侵襲制御学

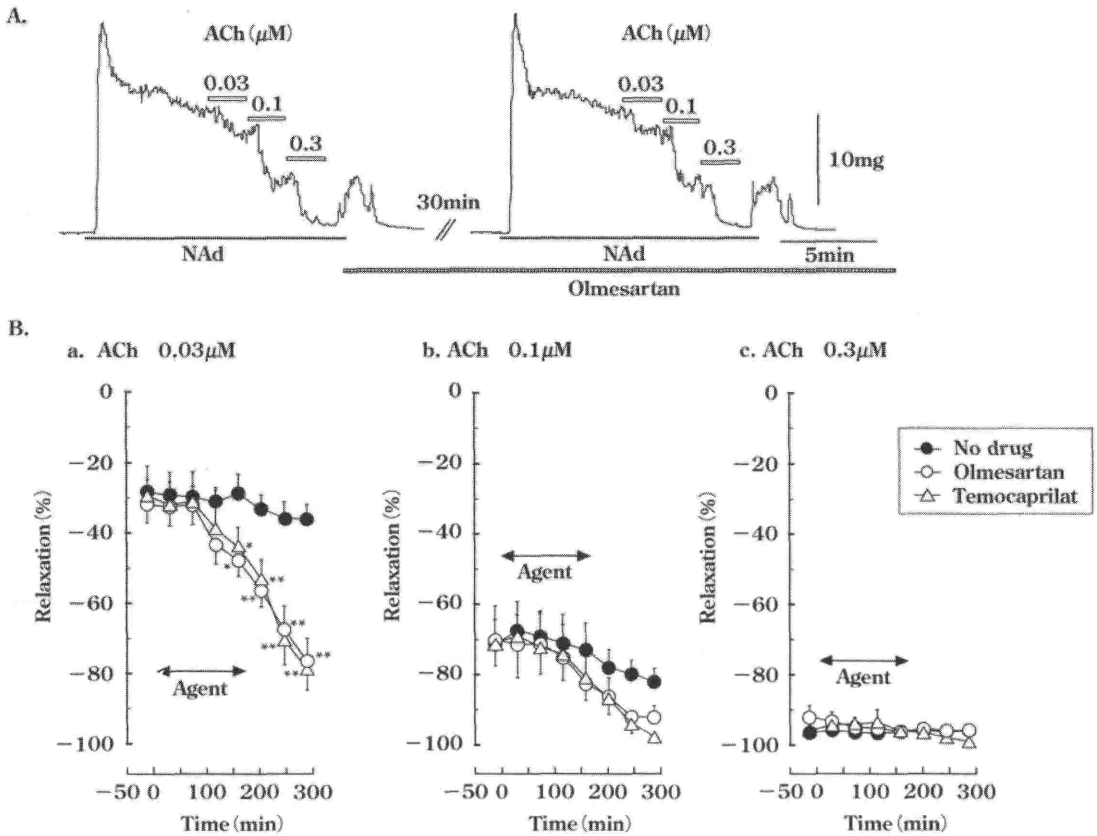


図1 AChによる内皮依存性弛緩反応に対する olmesartan と temocaprilat の効果

- A. 実験のプロトコールを示す. NAd 収縮の持続相で ACh を累積的に投与. このプロトコールを 30 分間隔で行った.
- B. Olmesartan と temocaprilat の時間依存性効果(文献 1 より引用).

て検討した(図1). ACh はノルアドレナリン(NAd)で収縮させた血管を濃度依存性に弛緩させた. 内皮除去標本ではこの ACh による弛緩反応が認められなかったことから, ACh は内皮依存性に血管を弛緩させると考えられる. オルメサルタン(1μM)や ACE 阻害薬テモカプリラート(1μM)は投与 1 時間後から 5 時間まで時間依存性に ACh による内皮依存性弛緩反応を増加し, この効果は NO 合成酵素阻害薬ニトロアルギニン(L-NNA)存在下で消失した. このことより, 血管壁に局在する Ang II は AT₁R の活性化により, 内皮由来 NO による弛緩反応を減弱させていると考えられた¹⁾.

オルメサルタンやテモカプリラートによる内皮由来 NO 依存性の弛緩反応増加の機序として, ① ACh による内皮細胞の NO 生成を増加する, また, ②生成した NO による平滑筋細胞の弛緩反応を増加する, などの機序が考えられる. そこで, 内皮

を温存した腸間膜細動脈標本での ACh による細胞内 cyclic GMP(cGMP) 産生に対するオルメサルタンの効果(4 時間前投与)を検討した. この標本で, ACh(0.1μM)は細胞内 cGMP 量を約 5.5 倍増加させた. また, NO 合成酵素阻害薬 L-NNA は ACh の cGMP 増加効果を完全に抑制した. オルメサルタン(1μM)は, ACh(0.1μM)による細胞内 cGMP 産生増加に影響を与えなかった. 一方, 内皮を除去した腸間膜細動脈標本で, NO ドナーである NOC-7(100nM)は細胞内 cGMP 量を 5.5 倍増加させた. オルメサルタン(1μM)はこの NOC-7 による細胞内 cGMP 産生に影響を与えなかった. オルメサルタン(1μM, 160 分投与)は内皮除去標本での NAd(10μM)-収縮に対する NOC-7(10nM)の弛緩反応を増加させた. これらの結果は, オルメサルタンが ACh による NO 生成量や cGMP 生成量に影響を与えることなく, 平滑筋細胞での cGMP による弛緩

反応を増加させる可能性を示唆する。そこで、 β -escin 処理により細胞膜透過性を増加させた平滑筋標本 (β -escin permeabilized skinned smooth muscle) を用いて、phosphodiesterase 抵抗性の cGMP 類似薬である 8-bromo-cGMP (8-Br-cGMP) の弛緩反応に対するオルメサルタン ($1\mu\text{M}$) の効果を検討した。この標本で、NAd ($10\mu\text{M}$) は $0.3\mu\text{M}$ Ca^{2+} 収縮を増強し、8-Br-cGMP ($10^{-8}\sim 10^{-5}\text{M}$) は NAd+GTP ($30\mu\text{M}$) 存在下での Ca^{2+} -収縮を濃度依存性に抑制した。オルメサルタン ($1\mu\text{M}$) はこの 8-Br-cGMP による弛緩反応を増強した。 β -escin skinned smooth muscles で、GTP γS ($30\mu\text{M}$) はアゴニスト非存在下で Ca^{2+} ($0.2\mu\text{M}$)-収縮を増強した。8-Br-cGMP ($10^{-8}\sim 10^{-5}\text{M}$) は Ca^{2+} +GTP γS による収縮を濃度依存性に抑制し、Ang II (0.1nM) はその弛緩反応を抑制した。

以上の結果より、生理的条件下でウサギ腸間膜動脈血管壁に存在する Ang II は、AT $_{1}$ R 活性化により、主に cGMP による弛緩反応を抑制することにより内皮由来 NO による弛緩反応を減弱させている可能性が考えられる。

血管に対する Ang II の急性作用

生理学や薬理学の教科書によると、急性に投与した Ang II は抵抗血管を収縮させ、この反応が Ang II による急性の血圧上昇反応に関与していると報告されている²⁾。これまでに我々は、摘出血管での Ang II の血管収縮反応は、一過性のみ(持続的に収縮を発生させない)であることを報告している³⁾。では、急性投与した Ang II の血管収縮反応が消失した時期にも、Ang II は持続的に血管内皮機能に影響を与えているのであろうか? この点について、検討した。

ウサギ肺内静脈でのヒスタミン ($10\mu\text{M}$) 収縮時に ACh ($10^{-8}\sim 10^{-5}\text{M}$) を投与すると弛緩反応が発生する。この ACh による弛緩反応は、内皮を除去した標本で消失(高濃度では逆に収縮を発生)することより、内皮依存性であると考えられる。内皮温存標本で、Ang II ($0.1\mu\text{M}$) は一過性のみ収縮を発生し、洗浄後に再び投与した Ang II はもはや収縮を発生しなかった("Desensitization")。このような条件下で、Ang II (10^{-8}M) +PD123319 (type 2 Ang II receptor antagonist, 10^{-6}M) 存在下でヒスタミ

ン-収縮を発生させ、その収縮中に ACh による弛緩反応変化を検討した。Ang II+PD123319 は ACh による内皮依存性弛緩反応を抑制した。この時、dihydroethidium 染色で検討した活性酸素発生量は変化しなかった。このことより、Ang II の収縮は一過性であるが、Ang II による内皮依存性弛緩反応の抑制は持続的であることが判明した。この Ang II による内皮依存性弛緩反応の抑制が肺内静脈だけではなく、他の血管系でも認められるか否かについて検討した。しかしながら、急性投与した Ang II による内皮依存性弛緩反応の抑制は、後中大脳動脈や細い冠状動脈では認められなかった。このことより、急性投与した Ang II による内皮機能抑制作用は、部位特異的に発現している可能性がある。

血管に対する Ang II の慢性作用

慢性的に血管壁に発現する Ang II 量を増加させる目的で、nitroglycerin (NTG) テープを 10 日間ウサギに貼付した (NTG 耐性ウサギの作成)。この動物から得た腸間膜細動脈標本では、血管壁の Ang II 量が増加するとともに、内皮細胞や平滑筋細胞の活性酸素産生が増加していた (図2)^{4,5)}。Diclofenac (cyclooxygenase inhibitor) 存在下で検討した ACh による内皮依存性弛緩反応は、コントロール動物と比較し NTG を慢性投与した動物から得た内皮温存腸間膜細動脈標本で著明に減弱していた。次に、どの内皮由来弛緩因子の機能が減弱しているのかを調べるため、EDHF を抑制する apamin + charybdotoxin (apamin は small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel inhibitor; charybdotoxin は intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel inhibitor)、もしくは、NO 生成を抑制する L-NNA 存在下で、ACh による弛緩反応を検討した。NTG を慢性投与した動物から得た血管での NO および EDHF の機能はともに減弱していた。一方、NTG 慢性投与時に AT $_{1}$ R 受容体遮断薬オルメサルタンを併用投与すると、この内皮機能障害の発現が抑制された。

次に、NTG 慢性投与によって発生した腸間膜細動脈での内皮由来 NO 機能障害の発生機序について検討した。内皮細胞の NO 生成量は NO 感受性蛍光色素 DAF-2 にて *in situ* 条件下で測定した。コントロール動物より得た血管の内皮細胞で、ACh ($3\mu\text{M}$)

Angiotensin II

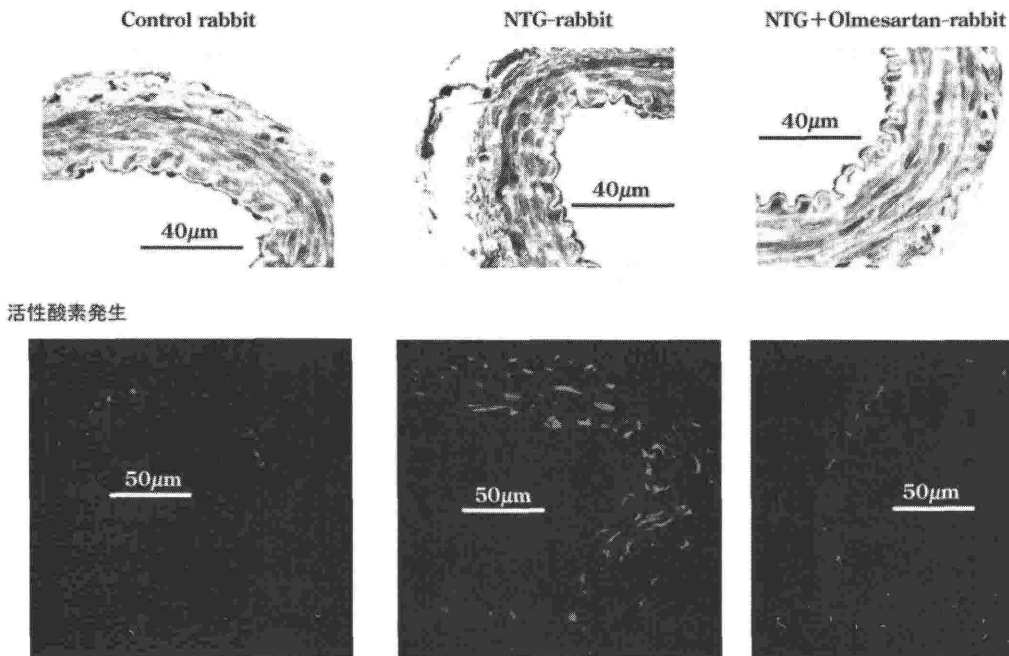


図2 NTG 慢性投与ウサギの腸間膜細動脈における Ang II の局在と活性酸素産生
NTG の慢性投与により血管壁の Ang II 量と活性酸素産生(dihydroethidium 染色で測定)量は増加した。
(文献5より引用)

は DAF-2 蛍光を著明に増加し, NO 合成酵素阻害薬 L-NNA はこの ACh による DAF-2 蛍光増加を完全に抑制した. 硝酸薬慢性投与動物より得た腸間膜細動脈内皮細胞における ACh の DAF-2 蛍光増加効果は有意に減弱していた. 一方, NTG 慢性投与時にオルメサルタンを併用投与した動物より得た内皮細胞では, ACh による NO 生成の減弱は認められなかった.

内皮細胞の活性酸素産生が増加した状態では, BH_4 が酸化される (BH_2 へと変化する) ことにより欠乏する. その結果, 内皮細胞の NO 合成酵素 (eNOS) は NO ではなくむしろ活性酸素を発生する (uncoupled eNOS と呼ばれている)⁶⁾. セピアプテリン (sepiapterin) はサルベージ経路により BH_4 量を増加させる⁷⁾. 本検討において, 活性酸素消去薬である Mn-TBAP はコントロール動物より得た腸間膜細動脈内皮細胞での ACh による NO 生成に影響を与えなかったが, NTG を慢性投与した動物より得た内皮細胞での ACh による NO 生成をコントロール動物のレベルまで回復させた. 一方, セピアプテリンは NTG 慢性投与した動物から得られた

内皮細胞での ACh による NO 生成に影響を与えなかった. eNOS による NO 生成の基質である L-arginine はコントロール動物から得た腸間膜細動脈内皮細胞の NO 生成に影響を与えなかったが, NTG を慢性投与した動物より得た内皮細胞での ACh による NO 生成を増大した (コントロール動物のレベルまで). 活性酸素は L-arginine transporter を酸化し, L-arginine に対する感受性を減少させると報告されている⁸⁾. このことより, 慢性的に内皮細胞に増加した Ang II は AT_1R を活性化し, 内皮細胞での活性酸素産生増加により, L-arginine transporter を抑制し (内皮細胞内での L-arginine availability の減少), eNOS による NO 生成を抑制する可能性が示唆された⁴⁾.

コントロール動物および NTG を慢性投与した動物より得た腸間膜細動脈平滑筋標本を用いて, NO-donor である NOC-7 による弛緩反応の変化について比較検討した. NTG を慢性投与した動物より得た血管平滑筋では NOC-7 による弛緩反応が減弱した⁹⁾. さらに, コントロール動物および NTG 慢性投与動物より得た β -escin skinned smooth muscle

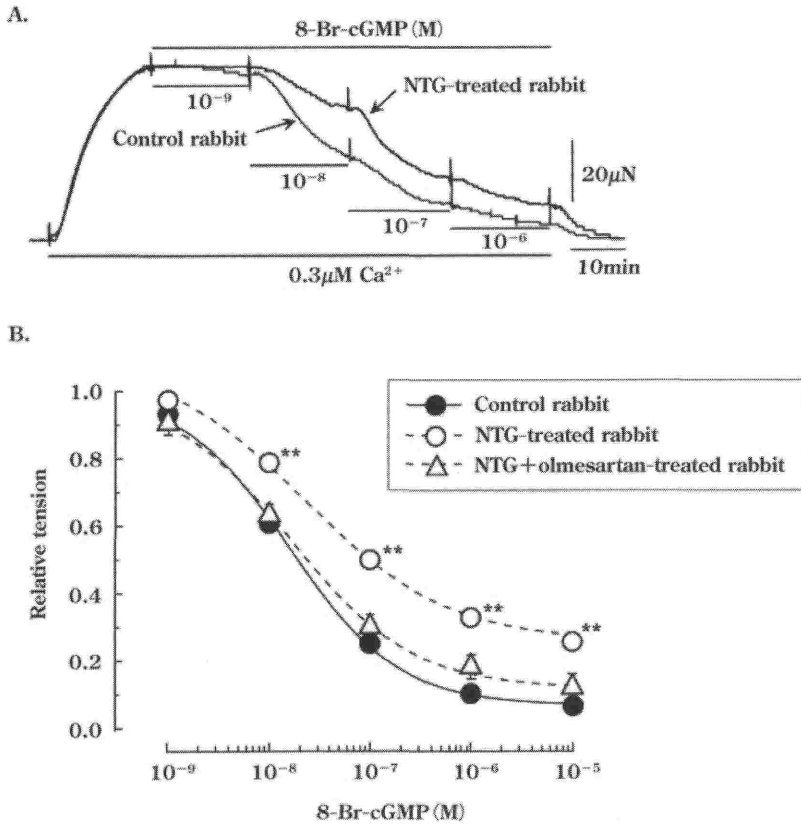


図3 β -escin skinned smooth muscles における 8-Br-cGMP の弛緩反応. (文献 9 より引用)

を用いて、8-Br-cGMP による弛緩反応変化について比較検討した。8-Br-cGMP ($10^{-8} \sim 10^{-6}$ M) は $0.3\mu\text{M Ca}^{2+}$ 収縮を濃度依存性に抑制したが、その効果はコントロール動物と比較し NTG 慢性投与動物で減弱した(図3)。NTG 慢性投与時にオルメサルタンを併用投与した動物では、8-Br-cGMP による弛緩作用の減弱は認められなかった。このことより、慢性的に平滑筋細胞に増加した Ang II は cGMP による弛緩反応を減弱することにより、内皮由来 NO による血管弛緩反応を抑制すると考えられた。このように、NTG の慢性投与により抵抗血管の内皮細胞と血管平滑筋細胞に増加した Ang II は、これらの細胞の AT₁R 活性化により活性酸素産生を増加し、内皮細胞においては NO と EDHF の機能障害を発生させ、一方、平滑筋細胞においては NO による弛緩反応を抑制することにより、内皮機能障害を発生させる可能性が示唆された。

おわりに

以上の結果より、①生理的条件下で血管壁に局在する Ang II は内皮由来 NO による弛緩反応を抑制する、また、②急性に増加した Ang II は一過性にのみ収縮を発生させるとともに、血管特異的に持続性的の内皮機能障害を発生させる、さらに、③慢性的に血管壁に増加した Ang II は、血管壁の活性酸素産生を増加させ、内皮由来 NO や EDHF の機能を障害するとともに、血管平滑筋細胞における NO による弛緩反応を減弱させる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Itoh T, Kajikuri J, Tada T, et al: Angiotensin II-induced modulation of endothelium-dependent relaxation in rabbit mesenteric resistance arteries. J Physiol 2003; 548: 893-906.
- 2) Jackson EK: Renin and Angiotensin. In: Brunton L, editors, Goodman & Gilman's The Pharmacological Ba-

- sis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill; 2006. p.789-821.
- 3) Satoh S, Itoh T, Kuriyama H: Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *Pflügers Arch* 1987; 410: 132-8.
 - 4) Yamamoto T, Kajikuri J, Watanabe Y, et al: Chronic nitroglycerine administration reduces endothelial nitric oxide production in rabbit mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 534-42.
 - 5) 伊藤猛雄, 梶栗潤子, 鈴木佳克: 抵抗血管の耐性におけるアンジオテンシンの役割. 編集 伊藤猛雄, 木之下雅彦, 硝酸薬耐性 Update. 東京: メディカル フロント インターナショナル リミテッド; 2004, p.43-64.
 - 6) Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, et al: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9220-5.
 - 7) Nichol CA, Lee CL, Edelstein MP, et al: Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by de novo and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 1546-50.
 - 8) Krotova KY, Zharikov SI, Block ER: Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L1037-44.
 - 9) Nakano Y, Kusama N, Kajikuri J: Role of PKC in the attenuation of the cGMP-mediated relaxation of skinned resistance artery smooth muscle seen in glyceryl-trinitrate-tolerant rabbit. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 391-8.