

血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシン II とアルドステロンのクロストークによる血管老化の促進作用についての検討

研究者氏名	関莉娟
日本研究機関	愛媛大学 分子心血管生物・薬理学
指導責任者	教授 堀内正嗣
共同研究者	岩井 将, 茂木正樹

要旨

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAS)の血管老化与える影響について検討した。ラットの胸部大動脈より調整した血管平滑筋細胞を用い、老化関連 β ガラクトシダーゼ染色にて細胞老化を評価し、細胞内シグナルの発現についてウエスタンブロットで検討した。酸化ストレスについては dihydroethidium によるスーパーオキシドアニオンの産生で評価した。Ang II (10^{-7} M) 連日刺激 5 日後より、老化 VSMC が増強した。老化細胞は選択的 AT₁ 受容体ブロッカー(ARB)のバルサルタンの投与により減少したが、ミネラルコルチコイド拮抗薬のスピロラクトン処置でも軽度減少した。Ang II 刺激により VSMC から Aldo 分泌も認め、Aldo 単独でも老化が促進された。このメカニズムには Ki-ras2A の増加や酸化ストレスの増強が関与していた。さらに、それぞれ単独の濃度で影響しない低濃度の Ang II (10^{-9} M)と Aldo (10^{-12} M)の両者の併用で、老化特異的染色細胞数の有意な増加が認められ、Ki-ras2A の発現や酸化ストレス、NADPH オキシダーゼ活性の相乗的な増加が認められた。以上から血管老化に RAS の相互作用が関与していることが示唆された。

Key Words アンジオテンシン II, アルドステロン, 血管平滑筋細胞, 老化, 酸化ストレス

緒言

近年、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAS)は血管の老化に影響を与え、動脈硬化の発症に深く関与することが示唆されている。我々はこれまでにアルドステロン(Aldo)とアンジオテンシン(Ang) II が血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖において相乗的に関与していることを報告した。このメカニズムに Ras ファミリーの一つである Ki-ras2A の増加が関連しており、Ki-ras2A は老化にも影響することから、Aldo と Ang II が VSMC の血管の老化にも影響しているのではと考えた。そこで、VSMC の老化における Aldo と Ang II の相互作用について検討した。

対照と方法

Sprague-Dawley ラットの胸部大動脈より調整した血管平滑筋細胞を用い、細胞の老化は、老化関連 β ガラクトシダーゼ(SA- β -gal) 染色を行い評価し、p53、p21、p16、p27 などのサイクリン依存性キナーゼ(CDKI)の発現の増大や増殖シグナルに対する反応性の低下なども老化の指標として検討した。また細胞内シグナルの発現についてはウエスタンブロットで検討し、より詳しい検討には siRNA による遺伝子ノックダウン法も用いた。酸化ストレスについては dihydroethidium によるスーパーオキシドアニオンの産生で評価した。

結果

VSMC は連日の Ang II (10^{-7} M) 刺激により細胞数は初めの 5 日間は増加を認めたが、その後はプラトーとなり、SA- β -gal 染色の陽性細胞数の割合は Ang II 刺激 5 日後より増強した(図 1 参照)。これらの老化の指標は選択的

AT₁ 受容体ブロッカー (ARB) のバルサルタン の投与によりほぼ完全に抑制されたが、ミネラルコルチコイド拮抗薬のスピロラクトン処置でも部分的に抑制された。また、老化特異的染色細胞が増加するのに伴って、CDKI の発現の増加や増殖因子刺激による反応性の低下も同様に認められた。スピロラクトン処置により VSMC の老化細胞数が部分的に抑制されたことから、Aldo の関与も示唆されたため、Ang II 刺激により VSMC からの Aldo 分泌について検討したところ、Aldo が時間依存的に増加し、VSMC からアルドステロンが分泌されていることがわかった。そこで VSMC に分泌濃度の Aldo を単独で投与したところやはり老化が促進された。このことから、Ang II (10⁻⁷ M) 刺激により、Ang II だけでなく、分泌される Aldo によっても VSMC の老化が相加的に促進されることが示唆された。この詳しいメカニズムについて検討すると、Ang II 又は Aldo 刺激により Ki-ras2A の発現は時間依存的に増加し、Ki-ras2A-siRNA を用いて Ki-ras2A 遺伝子をノックダウンすると Ang II 刺激による老化の指標は有意に抑制されたことから Ki-ras2A タンパクの増加の影響が考えられた。また、Ang II 又は Aldo 刺激により酸化ストレスや NADPH オキシダーゼ活性の増加を認めたことから、抗酸化剤であるスーパーオキシドデスムターゼ (SOD) や N-アセチルシステイン (NAC)、Rotenone、Antimycin-A を添加したところ、老化特異的染色細胞数と Ki-ras2A の発現の部分的な減弱が認められた。

さらに、それぞれ単独の濃度では、頻回刺激しても細胞老化は来さない低濃度の Ang II (10⁻⁹ M) と Aldo (10⁻¹² M) の両者を同時に添加して VSMC を刺激したところ、老化特異的染色細胞数の有意な増加が認められた (図 2 参照)。また、CDKI の発現の増加や増殖因子刺激による反応性の低下も同様に認められた。そのメカニズムについて検討したところ、Ki-ras2A の発現や酸化ストレス、NADPH オキシダーゼ活性においても相乗的な増加が認められた。

考察

以上より RAS による VSMC の老化促進のメカニズムには、AT₁ 受容体を介した Ki-ras2A の発現の上昇や酸化ストレスの亢進が関与しており、分泌される Aldo も関与していることが示唆された。さらに老化に影響しない Ang II と Aldo でも両者が共存することで、低濃度であっても相乗的に老化を促進する可能性が考えられた。故に Ang II と Aldo の効果的な抑制は血管の老化の予防に重要であると考えられた。今後、増殖因子である RAS がなぜ老化を誘導するのかについて Ki-ras2A の下流である ERK やその他の MAP キナーゼ系に注目して検討を行っていく予定である。また、アンジオテンシン受容体 (AT₁、AT₂ 受容体) からのシグナルと血管老化についての詳しい検討もノックアウトマウスから調整した VSMC を用いて検討する予定である。

参考文献

Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Induce Mitogenic Response in Vascular Smooth Muscle Cells. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Circ Res. 97:434-442 (2005)

注：本研究は『The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension』ならびに『60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease』にて、ポスター発表された。
また、現在『Cardiovascular Research』に論文投稿中である。

作成日：2007年3月10日

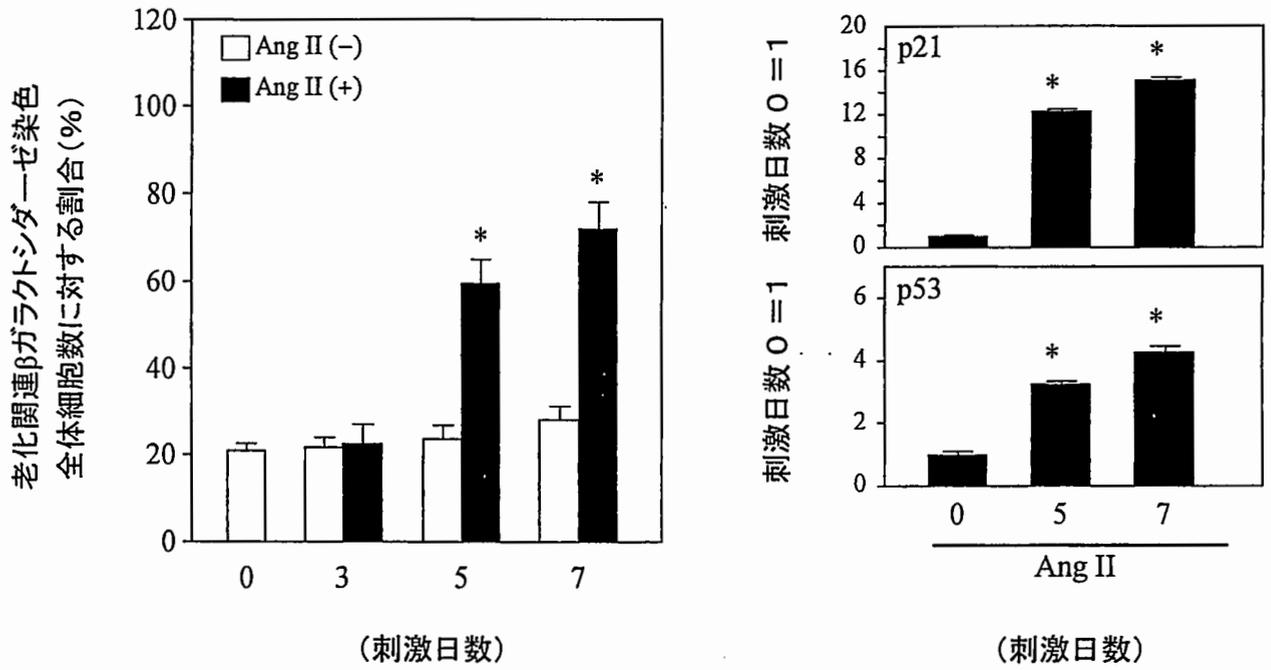


図1. アンジオテンシンII 刺激による老化細胞数の割合とサイクリン依存性キナーゼの発現の増加

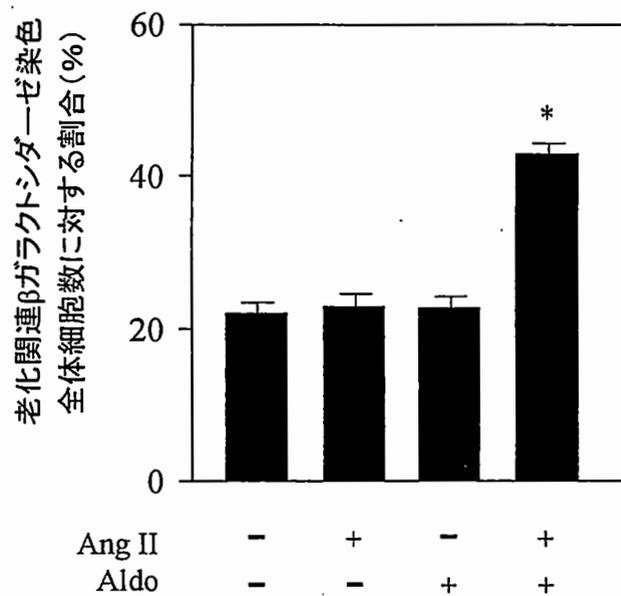


図2. 低濃度アンジオテンシンII とアルドステロン刺激による老化細胞数の割合の相乗的増加効果