

抗動脈硬化作用を有する心血管作動物質としてのレチノイン酸： その血管内皮機能および血管新生に及ぼす影響の検討

菅原 明¹ 宇留野 晃² 斉藤 明子³ 工藤 正孝² 伊藤 貞嘉²

要 旨：全トランス型レチノイン酸 (ATRA) の作用に関してわれわれは以下の新知見を得た。ATRAが内皮型一酸化窒素 (NO) 合成酵素活性化 / NO産生亢進を招来する。ATRAがヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 皮膚線維芽細胞の共培養系において血管新生を促進する。ATRAがHUVECにおいてさまざまな遺伝子の発現変動を誘導する。以上からATRAが血管内皮レベルで抗動脈硬化作用を示す可能性が示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 365-368)

Key words: nitric oxide, endothelium, angiogenesis, microarray

はじめに

レチノイン酸 (retinoic acid: RA) は天然のビタミンA誘導体である。生体内でビタミンAは全トランス型RA (all-trans retinoic acid: ATRA) に代謝された後、細胞内で容易に9シス型RAへと変換される (Fig. 1)^{1,2)}。ATRAは核内でRA受容体 (RAR) を活性化する一方で、9シス型RAはRARとレチノイドX受容体の両者を活性化する (Fig. 1)^{1,2)}。近年ATRAの血管系に対する有益な作用が注目されているが、特に血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMC) においては、ATRAがアポトーシス促進作用、増殖抑制作用や分化促進作用を示すこと¹⁻³⁾が報告されており、ATRAがVSMCレベルにおいて抗動脈硬化作用を示すものと考えられている。その一方で、ATRAの血管内皮に対する作用はいまだ不明の点が多い。

一般に動脈硬化性病変は、血管内皮障害が端緒となり発症する⁴⁾ことから、ATRAの抗動脈硬化作用の解明には血管内皮細胞 (endothelial cells: EC) レベルでの検討が必要と考えられる。今回われわれはATRAの血管内皮に及ぼす影響を明らかにする目的で、ECでの一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生に対するATRAの影響、

血管新生に対するATRAの影響、および ECでの遺伝子発現に及ぼすATRAの影響、の3点に関して検討を行い、興味深い知見が得られたので報告する。

血管内皮細胞でのNO産生に対する ATRAの影響

ヒト臍帯静脈 (human umbilical vein: HUV) ECおよびTRLEC-03を用いてECにおけるNO産生に及ぼすATRAの影響を検討した。NO蛍光検出用試薬であるDAF-2DA⁵⁾を用いてNO産生を測定したところ、ATRA (10nM ~ 1μM) 存在下にて著明なNO産生の増加が認められた⁶⁾。タイムコースを検討したところ、ATRA添加後24時間まではNO産生増加は認められず、48時間後にて増加が認められた⁶⁾。RARのアンタゴニストであるLE540の同時添加にてATRAによるNO産生増加が消失した⁶⁾ことから、ATRAはRARを介してNO産生を増加させたものと考えられた。ATRA添加により内皮型NO合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) タンパクの発現量の変化が認められなかった一方で、eNOSの1177番セリンの著明なリン酸化の増加が認められた⁶⁾。近年、PI3キナーゼ (K) Akt系によるeNOSの1177番セリンのリン酸化によりeNOSが活性化されるという報告がなされている⁷⁾ことから、本系におけるPI3K/Akt系の関与を検討した。PI3K阻害剤であるwortmanninの投与によ

¹東北大学病院総合診療部

²東北大学大学院腎・高血圧・内分泌学

³東北大学大学院小児病態学

2006年1月5日受付 2006年4月3日受理

りATRA誘導性のNO産生増加は完全に抑制された⁶⁾。さらに、ATRAは添加後48時間で、Aktタンパク量には影響を及ぼすことなくAktの473番セリンのリン酸化を著明に増加させた⁶⁾。そのリン酸化はwortmannin投与により完全に抑制された⁶⁾ことから、PI3K依存性であると考えられた。次に、ATRAのPI3Kに対する影響を検討したところ、ATRAは添加後48時間でPI3K活性の著明な増加およびPI3Kのcatalyticサブユ

ニットであるp110 β のタンパク発現を著明に増加させた⁶⁾。PI3K p110 β タンパク発現の増加はLE540の同時添加により抑制された⁶⁾ことから、RARを介したものであると考えられた。定量PCRにてATRAがPI3K p110 β のmRNA発現を誘導することが認められた。以上から、ATRAがRARを活性化した結果PI3K p110 β の発現が増加し、それに伴うPI3K活性上昇によるAktのリン酸化亢進の結果、eNOSのリン酸化および活性亢進が生じてNO産生が上昇したものと考えられた(Fig. 2)。以上から、ATRAがNO産生を増加させることにより、血管内皮機能の改善効果を有する可能性が強く示唆された。

血管新生に対するATRAの影響

ATRAの血管新生に対する効果に関してはいまだ不明の点が多い。そこで今回われわれは、ヒト皮膚線維芽細胞(normal human dermal fibroblasts: NHDF)とHUVECを共培養させた管腔形成初期段階の増殖状態のキット(血管新生キット, KURABO製⁷⁾)を用いてATRAの血管新生に及ぼす影響を検討した。種々の濃度のATRA投与下で11日間培養を行った後に抗CD31抗体を用いて形成された管腔を染色したところ、ATRA(1nM ~ 1 μ M)存在下にて管腔形成が著明に亢進することが認められた(Fig. 3)ことから、ATRAが血管新生促進作用を有するものと考えられた。preliminaryな結果として、ATRAがNHDFからの血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の産生・分泌

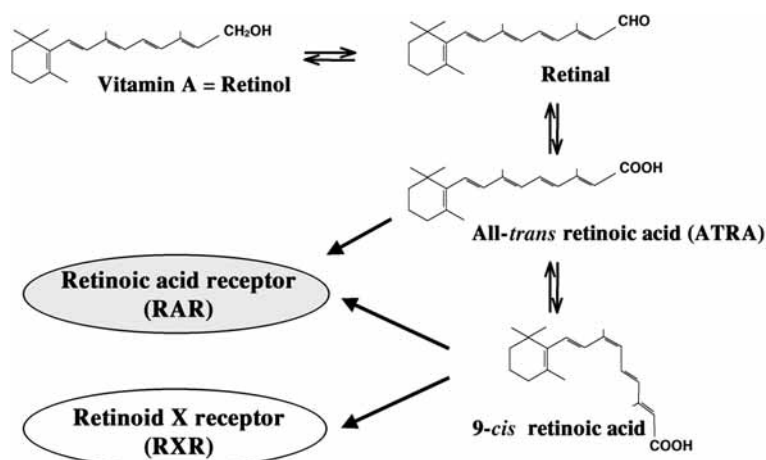


Figure 1 Metabolism and receptors of retinoic acid.

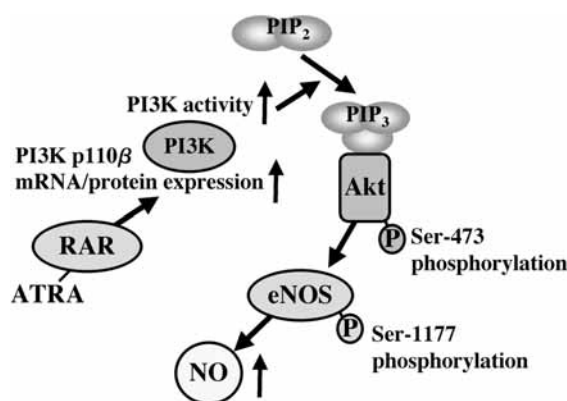


Figure 2 Effects of ATRA on eNOS phosphorylation/NO production.

を刺激する、ATRAの血管新生促進作用はVEGF中和抗体の投与により完全に抑制される、ATRAの血管新生促進作用はVEGF受容体-1中和抗体の投与にては影響を受けなかった一方で、VEGF受容体-2中和抗体の投与にて抑制される、等が認められた。以上から、ATRAによりNHDFにて誘導された内在性VEGFがVEGF受容体-2を介して血管新生に関与していることが推定された。

ECでの遺伝子発現に及ぼすATRAの影響

ECでの遺伝子発現に及ぼすATRAの影響を、マイクロアレイを用いて検討した。80%コンフルエントと

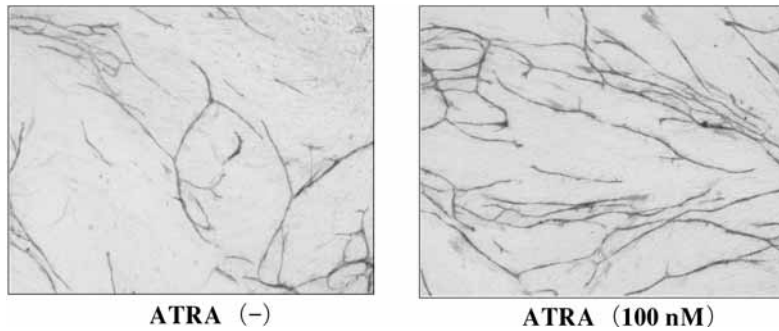


Figure 3 Stimulatory effects of ATRA on angiogenesis.

Table 1 Representative genes affected by low dose ATRA treatment

Genes increased more than 2.0-fold	
VE-cadherin	3.7-fold
RXR α	2.4-fold
CD34	2.0-fold
Prostaglandin E2 (EP1) receptor	2.0-fold
Genes decreased less than 0.5-fold	
c-myc	0.43-fold
Cyclin C	0.43-fold
Cyclin D3	0.50-fold
Cyclin-dependent kinase 5	0.48-fold
Bcl-2-related protein A1	0.47-fold
PUMA	0.40-fold
CXCR-2	0.33-fold
Interferon gamma receptor 2	0.48-fold
CCL18	0.47-fold
CCL26	0.41-fold
MMP10	0.35-fold
MMP24	0.40-fold
MMP2	0.37-fold

なったHUVECに、低濃度(10nM)または高濃度(1 μ M)のATRAを添加し、24時間後にトリゾールを用いてRNAを抽出した。ヒト遺伝子が約3万5千種類搭載されたオリゴDNAマイクロアレイ(Array-Ready Oligo Sets, Operon Biotechnologies社製⁹⁾)と得られたサンプル間でCy5を用いた単色ハイブリダイゼーションを施行し、データ解析を行った。低濃度ATRA投与にては4136遺伝子が2.0倍より大きな発現増加を、4007遺伝子が0.5倍未満の発現減少を示した。高濃度ATRA投与にては2979遺伝子が2.0倍より大きな発現増加を、2948遺伝子が0.5倍未満の発現減少を示した。Table 1に示されるように、低濃度ATRA投与にては血管新生促進因子である血管内皮(vascular endothelial: VE)カドヘリンの発現増加が認められた。その一方で、種々のケモカインおよびケモカイン受容体、細胞周期の調節因子群や、マ

Table 2 Representative genes affected by high dose ATRA treatment

Genes increased more than 2.0-fold	
VE-cadherin	2.3-fold
VEGF-C	2.2-fold
Urokinase-type plasminogen activator	2.1-fold
Genes decreased less than 0.5-fold	
Caveolin 1	0.37-fold
MMP7	0.40-fold
MMP10	0.24-fold

トリックス分解酵素(matrix metalloproteinase: MMP)群の発現抑制が低濃度ATRA投与により認められた。高濃度ATRA投与(Table 2)にては、VE-カドヘリンに加えてVEGF-Cや、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化

因子の発現増加が認められた一方で, MMP群やカベオリンの発現抑制が認められた。以上から, ATRAが種々の血管新生促進因子の発現を誘導する一方で, さまざまな動脈硬化促進因子や増殖促進因子の発現を抑制することが明らかとなり, ATRAがECにおいて血管新生促進作用や抗動脈硬化作用を示す可能性が示唆された。

おわりに

本研究結果から, ATRAがECにおいてeNOS活性化・NO産生亢進を誘導すること, ATRAが血管新生促進作用を有すること, さらには ATRAがECにおける血管新生や動脈硬化に関連した多くの遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。ATRAの臨床適応は現時点では急性前骨髄性白血病に限られているが, 少量のATRAまたは合成レチノイドを用いての, 抗動脈硬化療法および治療の血管再生療法への将来的な臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Miano JM, Berk BC: Retinoids: new insight into smooth muscle cell growth inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 724–726.
- 2) Miano JM, Berk BC: Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res*, 2000, **87**: 355–362.
- 3) Uruno A, Sugawara A, Kudo M et al: Transcription suppression of thromboxane receptor gene expression by retinoids in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*, 2003, **26**: 815–821.
- 4) Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115–126.
- 5) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K et al: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal Chem*, 1998, **70**: 2446–2453.
- 6) Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H et al: Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation*, 2005, **112**: 727–736.
- 7) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B et al: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 1999, **399**: 601–605.
- 8) Saito M, Hamasaki M, Shibuya M: Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Sci*, 2003, **94**: 782–790.
- 9) van de Peppel J, Kemmeren P, van Bakel H et al: Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarray experiments. *EMBO Rep*, 2003, **4**: 387–393.

Effects of Retinoic Acid on Vascular Endothelial Cells and Angiogenesis

Akira Sugawara,¹ Akira Uruno,² Akiko Saito,³ Masataka Kudo,² and Sadayoshi Ito²

Department of ¹Comprehensive Medicine, ²Medicine, and ³Pediatrics,
Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

Key words: nitric oxide, endothelium, angiogenesis, microarray

A natural retinoid all-*trans* retinoic acid (ATRA) contains various beneficial effects on vasculatures including suppression of neointima formation after balloon injury. Since little is known regarding ATRA effects on vascular endothelial cells (ECs) and angiogenesis, we conducted a study to determine how ATRA affects vascular ECs and angiogenesis. First we examined the effects of ATRA on nitric oxide (NO) production in vascular ECs. Interestingly, ATRA was observed to stimulate NO production via phosphorylation of endothelial NO synthase at Ser-1177. Next, we examined the effects of ATRA on angiogenesis using a novel co-culture system of human umbilical vein (HUV) ECs and normal human dermal fibroblasts, and observed its stimulatory effects on angiogenesis. Finally, we examined the effects of ATRA on gene expression in ECs by DNA microarray analyses using RNAs prepared from HUVECs incubated with ATRA for 24 hours. ATRA was observed to affect expression of many genes that might result in stimulating angiogenesis, leading to inhibition of atherosclerosis. Our study suggest that ATRA may be a novel candidate for treatment of atherosclerosis and for therapeutic angiogenesis.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 365–368)

Online publication August 18, 2006

脈管学 Vol. 46, 2006